

Camila Ângela Zanella

EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE BICUCULINA NA MATÉRIA
CINZENTA PERIAQUEDUTAL DORSAL EM RATOS
SUBMETIDOS A UM CONDICIONAMENTO OLFATÓRIO
AVERSIVO

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Centro de
Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito parcial à
obtenção do título de mestre em
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Antônio de
Pádua Carobrez.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor através do
Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zanella, Camila Ângela

Efeito da microinjeção de bicuculina na
matéria cinzenta periaquedutal dorsal em ratos
submetidos a um condicionamento olfatório aversivo
/ Camila Ângela Zanella; Orientador: Antônio de
Pádua Carobrez - Florianópolis, SC, 2015.
89p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós- Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Condicionamento Olfatório
Aversivo. 3. Comportamentos defensivos. 4.
Transmissão GABAérgica. 5. Substância Cinzenta
Periaquedutal. I. Carobrez, Antônio de Pádua. II
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título

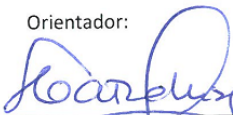
**“Efeito da microinjeção de bicuculina na matéria cinzenta periaquedutal dorsal
de ratos submetidos a um condicionamento olfatório aversivo”**

Por

Camila Angela Zanella

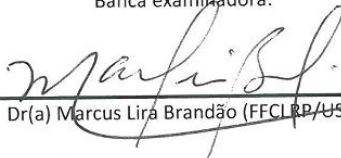
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (001/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Antonio de Pádua Carobrez (FMC/CCB/UFSC)

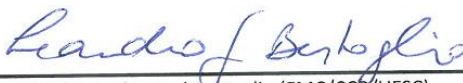
Banca examinadora:



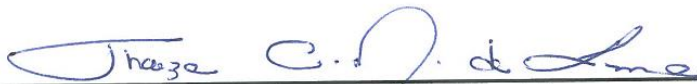
Dr(a) Marcus Lira Brandão (FFCLRP/USP)



Dr(a) Eloisa Pavesi (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a) Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez por me proporcionar muito mais do que a oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, agradeço pelos momentos ricos em discussões científicas nas quais eu via o quanto precisava e podia aprender mais. Agradeço pelas perguntas não respondidas às quais tive que pensar em dobro para respondê-las e agradeço principalmente pela sua orientação.

Aos professores do departamento de farmacologia, aos colegas de laboratório, Franklin por me ensinar os protocolos experimentais e pelas discussões de resultados, artigos e ideias. A Karina, Cristiane, Juliana Cavalli e Juliana Kroon. Aos pós-doutorandos que chegaram ou voltaram ao laboratório Marcelo e Eloisa. Obrigada Marcelo por me auxiliar na compreensão da neurociência. A Mari, amiga e técnica, obrigada por toda ajuda e suporte experimental. À Carol e a Marina, obrigada pelo apoio e pelas risadas. As alunas de iniciação científica Anaidalina e Julia.

Agradeço aos professores Dr. Marcus Lira Brandão, Dr. Leandro José Bertoglio, Dr. Eloisa Pavesi e Dr. Thereza C. Monteiro de Lima pela avaliação e sugestões que melhoraram muito este trabalho.

Agradecimento especial a minha mãe, Rosa Maria Zanella, agradeço pelo amor e apoio incondicionais, ao Leonardo, agradeço pelo amor, carinho e apoio. Aos meus novos amigos de Florianópolis os quais tiveram que ouvir muito sobre farmacologia, Raquel, Eveline, Juliana, Maíra Julia Vendrami. Aos colegas e amigos do mestrado, Tiago, Lucas, Fernanda, Cris e todos os outros que apesar do pouco tempo sempre nos mantemos unidos e dispostos a ajudar uns aos outros.

Aos meus amigos de Erechim que mesmo longe, me apoiaram e acreditaram em mim, Claudiele, Junior, Daiane, Graziela, Tulio. Aos orientadores da minha graduação que me despertaram para ciência e ainda me apoiam Dr. Silvane Roman e Dr. Rogério Cansian. Ao Dr. André Colla e a Paula Dias que me ajudaram quando cheguei à UFSC. Agradeço a todos os funcionários da UFSC, a Sheila, aos profissionais que matem os ambientes agradáveis ao trabalho. Agradeço ao apoio financeiro das instituições de fomento à pesquisa CAPES e ao CNPQ que possibilitam minha dedicação exclusiva à ciência. E também agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

A elaboração e a expressão de respostas defensivas são mediadas pela matéria cinzenta periaquedutal (MCP). A estimulação da MCP dorsal é capaz de dar suporte a um condicionamento funcionando como um estímulo incondicionado. Desta forma, o animal pode desencadear um processo de aprendizado e o estímulo inicialmente neutro passa a evocar respostas defensivas. A transmissão GABAérgica age no controle inibitório tônico desta estrutura e o bloqueio de GABA promove a expressão de respostas defensivas. O presente trabalho teve como objetivo investigar se a estimulação gerada a partir do bloqueio dos receptores GABA_A na MCPd seria um estímulo incondicionado eficaz em promover aprendizagem no modelo de condicionamento olfatório aversivo. Os animais receberam microinjeções de NMDA 50 pmol, PBS e antagonistas do receptor GABA_A (bicuculina) nas doses de 20 e 40 pmol durante a sessão de condicionamento com durações de 10 ou 20 minutos. A pista olfatória neutra utilizada como estímulo condicionado foi 20 µl de eugenol nesta etapa de aquisição do condicionamento, foram observados os comportamentos defensivos e exploratórios emitidos pelos ratos. Transcorridas 24h os animais foram testados em uma caixa de odor (novo contexto) com 20 µl de eugenol e os parâmetros tempo de aproximação à fonte de odor, tempo no compartimento escondido e avaliação de risco foram observados. No terceiro e último dia de experimento os animais foram re-testados na caixa de odor, sendo os mesmos parâmetros avaliados, porém sem pista olfatória. Durante o condicionamento os animais pertencentes ao grupo NMDA 50 pmol, bicuculina 20 e 40 pmol nos dois tempos empregados, reduziram significativamente os comportamentos exploratórios comparados com o grupo PBS. Os animais tratados com bicuculina desencadearam respostas defensivas robustas, caracterizadas por fuga, saltos e congelamento com maior duração e intensidade do que nos animais tratados com NMDA. Com relação à evocação observada na caixa de odor em dias subsequentes, os animais tratados com NMDA mostraram um aumento no tempo escondido, uma redução no tempo de aproximação à fonte de odor e do comportamento de avaliação de risco. Estas mudanças foram detectadas a partir do terceiro minuto do primeiro teste e foram mantidas no segundo teste, sugerindo que houve expressão da memória aversiva. Contudo, para os animais tratados com bicuculina as respostas frente ao odor foram iguais às do grupo PBS. Apesar do tratamento com bicuculina desencadear mais comportamentos defensivos na sessão de condicionamento, esta resposta não foi preditiva

de aprendizagem frente ao estímulo condicionado. Com base nos resultados experimentais conclui-se a capacidade de induzir comportamentos defensivos durante a sessão de condicionamento não permite “*per se*” prever a formação de uma memória aversiva no protocolo de condicionamento olfatório aversivo. Desta forma, nas presentes condições experimentais a estimulação da MCPd por meio do bloqueio dos receptores GABA_A, não foi um EI eficaz para promover aprendizagem.

Palavras-chave: condicionamento olfatório aversivo, matéria cinzenta periaquedutal, bicuculina, GABA

ABSTRACT

The development and expression of defensive responses are mediated by MCP. The dorsal MCP stimulation is able to promote a conditioning serving as an unconditioned stimulus able to generate defensive reactions which can be paired with a neutral cue. In this way, a learning process can be triggered, after this, the neutral stimulus will evoke defensive responses. The GABAergic transmission acts on the tonic inhibitory control of this structure, to block this transmission, result in defensive responses expression. The present study aimed to investigate whether the blockade of GABA_A receptors in MCPd would be an effective unconditioned stimulus to promote learning in the olfactory fear conditioning model. Animals were microinjected with NMDA (50 pmol), PBS or GABA_A receptor antagonist (bicuculline) at doses of 20 and 40 pmol during the conditioning session. The neutral cue used was 20 µl of eugenol odor. After 24h animals were tested, and for this, they were exposed to the odor box (new context) with 20 µl of eugenol and: the hide time, approach time and head out parameters were registered. In the third and final day of experiments animals were re-tested in the odor box, being the same parameters evaluated, without the olfactory cue. During conditioning, 10 min for the NMDA 50 pmol group, 10 /20 min for bicuculline 20 and 40 pmol significantly reduced exploratory behavior compared to the PBS group. Animals treated with bicuculline triggered robust defense responses, characterized by flight, jumps and freezing in duration and intensity greater than that observed in NMDA. In regard to the learning process, observed in odor box, NMDA treated animals showed an increase in the hide time, reducing the approach and head out time. These changes were detected starting from the third minute of the first test and were kept in the second test, suggesting that there was learning process. However, in animals treated with bicuculline, the responses on the odor box were similar to the PBS group. Although treatment with bicuculline triggers stronger defensive behaviors than NMDA in the conditioning session, these responses cannot be related to learning process of the paired cue. Based on these experimental results, the intensity of defensive behaviors during conditioning session does not allow "*per se*" to predict the acquisition of an aversive olfactory memory. Thus, in these experimental conditions, the stimulation of dPAG through GABA_A receptors blockade, is not an unconditioned stimulus effective to promote learning.

Keywords: Olfactory fear conditioning, periaqueductal gray matter, bicuculline, GABA

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Receptor GABAérgico.....	25
Figura 2. Protocolo experimental utilizado.....	33
Figura 3. Diagrama esquemático de cortes coronais do encéfalo de rato mostrando a MCPd.....	35
Figura 4. Efeito da microinjeção de NMDA no tempo gasto nos comportamentos exploratórios e comportamentos defensivos durante 10 min.....	37
Figura 5. Avaliação minuto-a-minuto no tempo gasto em comportamentos defensivos e exploratórios exibidos por ratos imediatamente após receberem uma injeção de PBS ou NMDA 50 pmol na MCPd.....	39
Figura 6. Distância percorrida durante a sessão de condicionamento...	40
Figura 7. Efeito da microinjeção de 50 pmol de NMDA na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório e ao contexto.....	42
Figura 8. Efeito da microinjeção de NMDA na estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2.....	46
Figura 9. Efeito da microinjeção de bicuculina no tempo gasto nos comportamentos exploratórios e comportamentos defensivos durante 10 min.....	46
Figura 10. Efeito da microinjeção de bicuculina no tempo gasto nos comportamentos exploratórios e comportamentos defensivos durante 20 min.....	47
Figura 11. Avaliação minuto-a-minuto do tempo gasto em comportamentos defensivos e exploratórios exibidos por ratos	

imediatamente após receberem uma injeção de PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol.....	49
Figura 12. Distância percorrida durante a sessão de condicionamento.....	52
Figura 13. Efeito da microinjeção de 20 e 40 pmol de bicuculina na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório e ao contexto	53
Figura 14. Efeito da microinjeção de bicuculina na estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2.....	55
Figura 15. Efeito da microinjeção de 20 e 40 pmol de bicuculina na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório.....	57
Figura 16. Efeito da microinjeção de bicuculina na estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fuga observado durante a sessão de condicionamento.....	50
Tabela 2. Comportamento de recuo defensivo observado durante a sessão de condicionamento.....	50
Tabela 3. Comportamento de auto-limpeza observado durante a sessão de condicionamento.....	51
Tabela 4. Comportamento de <i>crouch sniffing</i> observado durante a sessão de condicionamento.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA- análise de variância
COA- condicionamento olfatório aversivo
EC1- estímulo condicionado 1
EC2- estímulo condicionado 2
EC- estímulo condicionado
EI- estímulo incondicionado
EIs- estímulos incondicionados
EPM- erro padrão da média
GABA_A- receptor para ácido gama-amino-butírico do tipo A
GABA- ácido gama-amino-butirico
GABA_B- receptor para ácido gama-amino-butírico do tipo B
GAD- enzima descarboxilase do ácido glutâmico
IP- Intraperitoneal
MCP- matéria cinzenta periaquedutal
MCPd- matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPdl- matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
NMDA- N-metil-D-aspartato
PBS- *phosphate-buffered saline* – Salina tamponada e fosfatada

SUMÁRIO

1.Introdução	19
1.1 Percepção e codificação de memórias aversivas	19
1.2 Matéria Cinzenta Periaquedutal	22
1.3 Sistema GABAérgico	24
1.4 Hipótese	26
2. Objetivo geral	27
2.1 Objetivos específicos	27
3. Material e métodos	29
3.1 Animais	29
3.2 Cirurgia Estereotáxica	29
3.3 Drogas, diluições e odor	30
3.4 Microinjeção intracerebral	31
3.5 Procedimentos experimentais	31
3.5.1 Comportamentos analisados	32
3.5.2 Protocolo experimental	32
3.5.2.1 Experimento 1- Condicionamento olfatório aversivo - utilizando a injeção de NMDA na MCPd como EI	33
3.5.2.2 Experimento 2- Condicionamento olfatório aversivo - utilizando a injeção de bicuculina na MCPd como EI	33
3.6 Histologia	34
3.7 Análise estatística	35
4. Resultados	37
4.1 Etapa 1- Condicionamento olfatório aversivo – utilizando a injeção de NMDA na MCPd como EI	37
4.1.1 Comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCPd com NMDA	41

4.1.2 Estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com NMDA durante exposição ao EC e ao contexto associado.....	41
4.2 Etapa 2- Condicionamento olfatório aversivo- utilizando a injeção de bicuculina na MCPd como EI	46
4.2.1 Comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCPd com bicuculina	46
4.2.2 Estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com bicuculina durante exposição ao EC e ao contexto associado – animais condicionados por 10 min.....	56
4.2.3 Estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com bicuculina durante exposição ao EC e ao contexto associado – animais condicionados por 20 min.....	56
5. Discussão.....	61
6. Sumário e Conclusão	71
Referências.....	73
ANEXOS.....	81

1. Introdução

1.1 Percepção e codificação de memórias aversivas

Os sistemas sensoriais proporcionam uma percepção refinada do meio ambiente. O fluxo constante de estímulos externos: olfatórios, visuais, auditivos, entre outros, fornecem informações importantes ao indivíduo, garantindo que o mesmo possa adaptar suas ações de acordo com a situação na qual ele se encontra (HOMBERG, 2013; KEELER e ROBINS, 2011).

O sistema olfatório apresenta grande relevância para os roedores, possibilitando desde encontrar alimento até evitar o contato com predadores naturais (RESTREPO, ARELLANO, *et al.*, 2004). O olfato detecta pequenas moléculas químicas voláteis, os odores. Estas moléculas são inicialmente reconhecidas pelos receptores de odor localizados nos neurônios sensoriais olfatórios, os quais estão localizados no epitélio olfatório sensorial que reveste a cavidade nasal. Cada neurônio projeta cílios para o lúmen nasal e é capaz de distinguir pequenas alterações na conformação química das moléculas odoríferas. O estímulo elétrico proveniente dos neurônios sensoriais conduz, por meio de um único axônio, a descrição de um determinado odor até do glomérulo, estrutura presente no bulbo olfatório no encéfalo. O bulbo olfatório promove o processamento primário dos odores. A partir daí, sinapses podem ser disparadas para estruturas intermediárias, como a amígdala ou o hipotálamo, sendo estas, estruturas importantes na modulação dos efeitos emocionais desencadeados por odores, até que eles atinjam o córtex olfatório e desencadeiem uma estratégia comportamental dependendo da valência do odor reconhecido (para revisão ver: MUNGER, LEINDERS-ZUFALL e ZUFALL, 2009; BUCK, 2005).

Roedores são animais que fazem parte das espécies que se guiam preferencialmente através do sistema olfatório. Desta forma, ratos são capazes de adquirir novas informações sobre odores, quando um odor apresenta uma valência negativa inata ocorre a expressão de respostas de defesa. Porém quando o odor apresenta uma valência neutra, após um procedimento de condicionamento clássico descrito primeiramente por Pavlov, (PAVLOV, 1927), o odor inicialmente neutro pode desencadear a expressão de respostas defensivas. Quando um estímulo olfatório neutro, é associado com um estímulo incondicionado (EI), terá a sua aversividade (negativa) ou atratividade (positiva) intrínseca alterada. No

caso de um pareamento com um EI de natureza aversiva, quando exposto ao estímulo condicionado (EC) de valência negativa, o animal passará a expressar um padrão de respostas de defesa similares às do EI (LEDOUX, 2000; LEDOUX, 2003).

Diferentes estímulos podem ser usados como EI. Alguns exemplos referem-se à estimulação elétrica, através de choques nas patas ou em estruturas cerebrais específicas. Estimulação química, por meio de microinjeções de agonistas ou antagonistas em estruturas cerebrais, tais como a matéria cinzenta periaquedutal (MCP) e o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd) ou ainda, administrações sistêmicas de drogas com características ansiogênicas, como o petilenotetrazol (CAVALLI, BERTOGLIO e CAROBREZ, 2009; KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012; LAL e EMMETT-OGLESBY, 1983).

Após o pareamento entre EC-EI, se houver expressão de respostas defensivas frente ao EC apenas, sugere-se que o estímulo neutro tornou-se condicionado. A esse evento dá-se o nome de condicionamento de primeira ordem (Estímulo Condicionado de 1ª ordem- EC1). Novas associações podem ser feitas a partir deste primeiro aprendizado, sem que haja necessidade do EI inicial. Considerando que o EC1 adquiriu após a associação uma valência negativa, o EC1 passa a promover associações com novas pistas ambientais e/ou contextos. Deste modo, um pareamento entre o EC1 – e um novo estímulo neutro promove um condicionamento de segunda ordem (EC2) (GEWIRTZ e DAVIS, 2000).

Os núcleos da amígdala, núcleos hipotalâmicos, matéria cinzenta periaquedutal (MCP), córtex pré-frontal, entre outros, participam em conjunto na interpretação das informações provenientes do meio ambiente permitindo ao indivíduo reagir aos eventos estressantes e/ ou que representem perigo, da forma mais adaptativa possível (LEDOUX, 2003; HERRY e JOHANSEN, 2014; BRANDÃO, CARDOSO, *et al.*, 1994).

Durante uma situação que representa perigo, dois momentos são evidentes. Quando uma fonte de perigo é detectada (quer represente medo inato ou aprendido), em um primeiro momento, evidenciam-se as respostas de defesa. Em um segundo momento, estruturas cognitivas ascendentes são informadas da situação e decidem se o evento foi relevante o suficiente para ser armazenado como uma memória. É neste momento em que diferentes núcleos encefálicos são ativados (GROSS e CANTERAS, 2012).

Existe uma distinção entre os substratos neurais que processam respostas de medo inatas - odor de predador - com relação aos substratos neurais que processam respostas de medo condicionado- odor pareado com o EI. O medo é processado de forma complexa e por circuitos independentes. Quando o odor de predador é detectado, a informação é transferida para a porção posteroventral do núcleo medial da amígdala, passando para a porção dorsomedial do hipotálamo ventromedial chegando na MCPdl. Entretanto, no medo aprendido a informação é transferida para a amígdala lateral e basolateral, após, essa informação é projetada para a amígdala central, e desta ocorrem projeções diretas que atingem a MCP (GROSS e CANTERAS, 2012).

No condicionamento olfatório mediado pela estimulação da MCPdl com NMDA, já foi demonstrada a existência de fibras ascendentes que passam pelo sistema periventricular. Estas fibras podem ser segregadas em duas vias: uma via dorsal que projeta para alvos talâmicos e uma via ventral que projeta para regiões subtalâmicas e hipotalâmicas. Kincheski e colaboradores padronizaram o protocolo de condicionamento olfatório no nosso laboratório. Durante este estudo foram observadas respostas defensivas e, posteriormente, aprendizado que ocorre devido à existência de fibras ascendentes. O protocolo consistiu de cinco dias experimentais dos quais dois eram destinados às sessões de familiarização, sem a presença do odor (KINCESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012).

As expressões de comportamentos gerados e modulados pela MCP são de suma importância para as respostas de defesa do indivíduo. Se a MCP for lesionada, as respostas defensivas são expressas em menor intensidade ou abolidas (SKULTETY, 1963; SCHENBERG e GRAEFF, 1978; BEHBEHANI, 1995). Dados moleculares mostram ativação neural nesta estrutura, evidenciado por um aumento da expressão da proteína *fos*, quando um rato entra em contato com o seu predador natural (CANTERAS e GOTO, 1999; COMOLI, RIBEIRO-BARBOSA e CANTERAS, 2003).

Atualmente, além da expressão de comportamentos defensivos, tem sido demonstrado que a estimulação da MCP participa de processos de aquisição de memórias aversivas (KINCESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012; MOCHNY, KINCESKI, *et al.*, 2013). A estimulação da MCP também parece auxiliar na modulação do condicionamento olfatório aversivo quando o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo é usado como EI (PAVESI, CANTERAS e CAROBREZ, 2011).

Desta forma, a MCP não pode ser considerada apenas uma via de saída de respostas defensivas (VIANNA e BRANDÃO, 2003), uma vez que a MCP recebe projeções de estruturas superiores como, por exemplo, do núcleo hipotalâmico anterior (AHN), parte dorsomedial do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMH) e também do núcleo pré-mamilar dorsal (PMd) (CANTERAS, 2002) ao passo que envia projeções para núcleos hipotalâmicos (AHN hipotálamo dorsomedial) (CAMERON, KHAN, *et al.*, 1995) e amígdala (RIZVI, ENNIS, *et al.*, 1991).

1.2 Matéria Cinzenta Periaquedutal

A MCP é uma estrutura mesencefálica que circunda o aqueduto cerebral, apresenta vias ascendentes e descendentes conectadas com outras regiões encefálicas, de forma a regular e do mesmo modo ser regulada por essas regiões, desencadeando o controle de funções motoras, sensoriais e autonômicas do indivíduo (DEPAULIS e BANDLER, 1991).

Anatomicamente, a MCP possui uma organização neuronal subdividida em colunas bem definidas, cada coluna estende-se longitudinalmente e é capaz de modular respostas comportamentais distintas (BANDLER e SHIPLEY, 1994). A divisão longitudinal compreende a porção rostro-caudal e apresenta ainda subdivisões em colunas: dorsal, dorsolateral, lateral e ventrolateral (CARRIVE, 1993).

A expressão de comportamentos defensivos e a elaboração de estados emocionais, como medo e a ansiedade, já foram evidenciados através de estimulação elétrica da MCP. Sugeriu-se que esta estimulação é aversiva, uma vez que ratos aprendem a pressionar uma alavanca de forma a cessar este estímulo. Em contrapartida, lesões nesta estrutura cessam estes comportamentos (GOMITA, MORIYAMA, *et al.*, 1991; GRAEFF, 1994; BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008). Lesões nas colunas dorsomedial e dorsolateral da MCP são capazes de atenuar medidas espaço-temporais de ansiedade no labirinto em cruz elevado (GOMES, AMARAL e NUNES-DE-SOUZA, 2011).

A MCP também regula processos de nocicepção. Ao ser moderadamente estimulada com glicina, por exemplo, é possível observar hiponocicepção, que ocorre devido a uma mudança no foco de atenção do animal para estímulos ambientais de risco (MARTINS, CAROBREZ e TONUSSI, 2008). A estimulação da MCP é usada para

gerar condicionamento aversivo em diferentes aparatos experimentais, de forma a promover um aprendizado associativo (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012; DI SCALA e SANDNER, 1989; ZANOVELI, FERREIRA-NETTO e BRANDÃO, 2007).

Diversos sistemas de neurotransmissores são encontrados na MCP: opióides (MOTTA e BRANDÃO, 1993), aminoácidos excitatórios (BITTENCOURT, CAROBREZ, *et al.*, 2004), ácido gama-aminobutírico (GABA) (BRANDÃO, BORELLI, *et al.*, 2005), e também neuropeptídeos como, por exemplo, a substância P (DE ARAÚJO, BRANDÃO e HUSTON, 1998). Cerca de 50% dos neurônios da MCP são excitados ao se usar um antagonista GABAérgico, fato este que sugere uma função fisiológica proeminente dessa neurotransmissão (REICHLING e BASBAUM, 1990; WILLIAMS e BEITZ, 1990).

É relevante notar que entre todos os sistemas de neurotransmissão acima citados, os quais também são extremamente importantes, o glutamato e o GABA caracterizam-se por serem respectivamente os principais neurotransmissores excitatórios e inibitórios do encéfalo (BEAR, CONNORS e PARADISO, 2008). Sabe-se que aminoácidos excitatórios desencadeiam efeitos similares à estimulação elétrica na MCP (CAROBREZ, TEIXEIRA e GRAEFF, 2001; BRANDÃO, ANSELONI, *et al.*, 1999). Dentre os receptores ionotrópicos de glutamato, agonistas do receptor NMDA desencadeiam respostas de fuga de um modo dependente da dose, além de modular a aquisição de memórias no condicionamento olfatório aversivo, quando utilizado como EI na MCP (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012).

Tem sido sugerido que a transmissão GABAérgica exerce uma inibição tônica na MCP. Ao retirar essa inibição, por meio do bloqueio de receptores GABA_A, também é possível observar comportamentos defensivos semelhantes aos da estimulação elétrica (GRAEFF, BRANDÃO, *et al.*, 1986). Por outro lado, comportamentos de fuga podem ser suprimidos com a administração de drogas benzodiazepínicas, mostrando um importante controle exercido pelo GABA na valência emocional aversiva que a MCP desencadeia (GELLER, KULAK e SEIFTER, 1962).

1.3 Sistema GABAérgico

Em 1950, Roberts e Awapara descobriram o GABA. Com base em estudos eletrofisiológicos posteriores, entre 1950 e 1965 sugeriram que o GABA atendia todos os critérios para ser classificado como um neurotransmissor nos mamíferos. Atualmente é consenso que o GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (OLSEN e BETZ, 2006; MARTIN e OLSEN, 2000; PIRKER, SCHWARZER, *et al.*, 2000).

O GABA pode ser encontrado em concentrações elevadas (milimolar) em muitas regiões do encéfalo. Estas concentrações são relativamente altas com relação às monoaminas clássicas, sendo que nas mesmas regiões o GABA pode estar cerca de 1000 vezes mais concentrado. O principal precursor para a produção de GABA *in vivo* é a glicose, apesar do piruvato e outros aminoácidos também atuarem como precursores. A enzima descarboxilase do ácido glutâmico (GAD) catalisa a descarboxilação do ácido L-glutâmico para formar GABA (MARTIN e OLSEN, 2000; OLSEN e BETZ, 2006). Após ocorrer despolarização do neurônio pré-sináptico o GABA é liberado na fenda sináptica e difunde-se até os receptores alvos. Sua ação termina ao ser recaptado por células gliais e pelo neurônio pré-sináptico (CHEN, REITH e QUICK, 2004; MADSEN, CLAUSEN, *et al.*, 2009).

Existem pelo menos duas classes distintas de receptor GABA: ionotrópicos, compreendendo GABA_A (Figura 1) e GABA_C (menos estudado) e metabotrópicos, receptores denominados GABA_B. Os receptores diferem em propriedades farmacológicas, eletrofisiológicas e bioquímicas. O receptor GABA_A, é um canal iônico dependente de ligante, composto de três subunidades diferentes (α , β , γ) que formam uma série de alfa-hélices. Cada subunidade do receptor é encontrada em vários subtipos. Como o potencial de equilíbrio dos íons cloreto é próximo de -70 mV, a abertura do canal, possibilita o influxo desses íons promovendo hiperpolarização da membrana plasmática, levando a uma diminuição da probabilidade de ocorrer um potencial de ação, consequentemente é gerada inibição neuronal (MACDONALD e OLSEN, 1994).

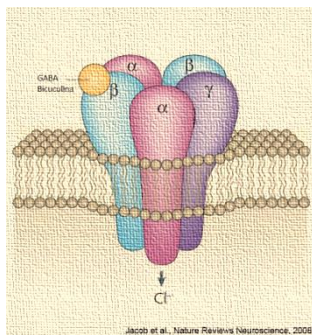


Figura 1. Receptor GABAérgico. (Fonte: adaptado de Jacob TC, SJ Moss and R Jurd.2008).

Os receptores GABA_B são receptores acoplados à proteína G e podem mediar inibição pós-sináptica e pré-sináptica (PINARD, SEDDIK e BETTLER, 2010; BOWERY, BETTLER, *et al.*, 2002).

Existem vários sítios de ligação nos receptores GABAérgicos, nos quais podem interagir agonistas e moléculas que facilitam a ação do GABA. Alguns fármacos permitem que o canal iônico abra em maior frequência (ex. benzodiazepínicos), ao passo que outros permitem que o canal iônico permaneça um período de tempo maior no estado aberto (ex. barbitúricos). Estas duas classes farmacológicas fazem com que haja um influxo de íons cloreto para dentro do neurônio acarretando em inibição neuronal. O oposto também ocorre no que se refere a antagonizar a atividade destes neurônios, ou seja, bloquear o canal impede a abertura do poro central e, desta forma impossibilita a inibição da célula neuronal, de forma a favorecer assim o aumento do potencial excitatório pós-sináptico (MEHTA e TICKU, 1999; JOHNSTON, 1996).

O receptor GABA_A está envolvido na plasticidade sináptica. De fato já foi demonstrado que o bloqueio destes receptores com bicuculina facilitou a indução de potenciação de longa duração em fatias hipocámpais (WINGSTROM e GUSTAFSSON, 1983). Entretanto, já foi sugerido que o GABA modularia a função evolutiva de esquecer informações consideradas irrelevantes para sobrevivência (KIM, MCNALLY e RICHARDSON, 2006).

Com relação à aquisição de memórias, sabe-se que o sistema GABAérgico desempenha um papel chave. A maioria dos estudos que manipula o sistema GABAérgico em condicionamentos de medo, utiliza a administração de agonistas do receptor durante a aquisição,

demostrando que a ativação deste receptor leva a um prejuízo cognitivo. A mesma conclusão é obtida com o uso de antagonistas GABAérgicos que, ao serem administrados antes da sessão de condicionamento, facilitam a formação da memória de medo (MAKKAR, ZHANG e CRANNEY, 2010).

1.4 Hipótese

Com base nos estudos descritos acima, a MCPd participa da expressão de respostas defensivas e da aquisição de memórias aversivas. Sabe-se ainda que a transmissão GABAérgica está presente em praticamente todas as subdivisões da MCP, com destaque para a região dorsal e dorsolateral. Considerando que a transmissão GABAérgica exerce importante controle inibitório tônico na MCPd, delineamos um conjunto de experimentos para testar a hipótese de que a modulação do sistema GABAérgico desencadearia respostas de defesa que serviriam como um EI para promover um condicionamento olfatório aversivo. No presente trabalho foi proposto que a estimulação da MCPd (MCP dorsolateral e MCP dorsal) gerada através do bloqueio dos receptores GABA_A, seria um EI eficaz em promover aprendizagem no modelo de condicionamento olfatório aversivo. Desta forma, foram analisadas as respostas de defesa durante o condicionamento olfatório aversivo, bem como durante a exposição ao EC e ao contexto associado.

2. Objetivo geral

Investigar o papel da sinalização GABAérgica da MCPd para a codificação de uma memória aversiva no modelo de condicionamento olfatório.

2.1 Objetivos específicos

Verificar os comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCPd com NMDA.

Investigar a estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com NMDA durante exposição ao EC e ao contexto associado.

Verificar os comportamentos defensivos e exploratórios durante o bloqueio dos receptores GABA_A na MCPd.

Investigar a estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com bicuculina (antagonista do receptor GABA_A) durante exposição ao EC e ao contexto associado.

3. Material e métodos

3.1 Animais

Para o presente estudo foram utilizados 300 ratos Wistar machos com $3\pm 3,5$ meses de idade, pesando entre 280 a 340g. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e após o desmame foram transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia. Quinze dias antes do início dos experimentos os animais foram deslocados para o Biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental. Nos biotérios os animais foram mantidos em condições experimentais ótimas, água e ração *ad libitum*, quatro animais por caixa e em ambiente climatizado em temperatura de $23\pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12h. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética sob número 042/CEUA/PROPESC/2013.

3.2 Cirurgia Estereotáxica

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, sete dias antes dos experimentos para a implantação de cânulas-guia na MCPd. As cânulas com comprimento final de 13 mm foram confeccionadas no nosso laboratório a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 7 mm, BD Precision Glide[®], Brasil) com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Brasil).

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com uma solução de quetamina (100 mg/ml/kg, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil) e xilazina (10 mg/ml/kg, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil)- na proporção de 3:2. Depois de testados os reflexos para verificar a completa analgesia, os animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting Co., EUA). O escalpo da cirurgia foi devidamente esterilizado com uma solução de álcool iodado (3%) e anestesia local e vasoconstrição, foram obtidos através de uma solução de cloridrato de norepinefrina e lidocaína (1:50.000, Dentsply Pharmaceutical, Brasil) aplicada na região da incisão pela via subcutânea. Após a incisão, o osso do crânio foi exposto e os pontos Bregma e Lambda foram tomados como referência para o posicionamento da cânula. As coordenadas utilizadas foram antero-posterior -7.6 mm a partir do Bregma, médio-lateral +1.9 mm e dorso ventral -2 mm para atingir a MCPd caudal e antero-posterior -5.8

mm, médio-lateral +1.9 mm e dorso ventral -3 mm para atingir a MCPd rostral (PAXINOS e WATSON, 1982).

Um parafuso de aço inoxidável foi fixado na estrutura óssea para impedir o deslocamento da cânula e do acrílico auto-polimerizável que, por sua vez, mantém a cânula fixa, na estrutura de interesse. Na cânula foi inserido um mandril de aço inoxidável nº: 30 (0,35 mm) para obstruí-la prevenindo seu entupimento. Após o término da cirurgia os animais foram tratados com antibiótico (pentabiótico: benzilpenicilina e estreptomicina) intramuscular (10 mg/kg; 60 000 IU; 0,2 ml; Fort Dodge, Brasil) e solução analgésica (banamine: flunixinmeglumina) via subcutânea (2,5 mg/kg; 0,2ml; Schering-Plough, Brasil) e permaneceram em uma sala aquecida até a recuperação da anestesia. Após os animais apresentarem recuperação completa dos movimentos, foram realocados ao biotério.

3.3 Drogas, diluições e odor

A estimulação química da MCP foi feita através da infusão de bicuculina (1(S),9(R)-(-)-Bicuculline methiodide, Sigma-Aldrich, Brasil Ltda.) e NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid, Sigma, St. Louis, MO). As dissoluções foram feitas em solução de 0,1 M de salina tampão fosfato (*phosphate-buffered saline*, PBS; pH 7,4). A dose de NMDA utilizada foi de 50 pmol (baseada em dados preliminares e trabalhos anteriores do laboratório KINCHESKI, MOTA-ORTIZ *et al.*, 2012).

Para a escolha das doses de bicuculina foi utilizado como referência o estudo de BORELLI, FERREIRA-NETTO, *et al.*, 2005 . Em um ensaio piloto, no nosso laboratório, nas nossas condições experimentais, esta dose mostrou-se capaz de desencadear uma resposta defensiva de alta intensidade na qual a integridade física dos animais ficava comprometida. Por este motivo foram escolhidas doses menores de 20 pmol (10 ng/0,2 µl) e 40 pmol (20 ng/0,2 µl).

O eugenol (SAFC, Kosher, China, ≥98%) foi utilizado como fonte de odor. Foi diluído em propilenoglicol até atingir a concentração de 1%. Em todos os casos foram utilizados 20µl de eugenol aplicados em um papel filtro de 4 cm x 4 cm.

Como agente analgésico, anti-inflamatório e antitérmico foi utilizado banamine (Flunixinina meglumina) administrado pela via subcutânea, na concentração de 2,5 mg/ml (Schering-Plough). Os animais

foram anestesiados com uma solução de quetamina (100 mg/ml/kg, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil) e xilasina (10 mg/ml/kg, Sespo Ind. Com. Ltda, Brasil)- um sedativo, analgésico e relaxante muscular respectivamente, pela via intraperitoneal. O antibiótico de amplo espectro benzilpenicilina (10 mg/kg; 60 000 IU; 0,2 ml; Fort Dodge, Brasil) foi administrado pela via intramuscular.

3.4 Microinjeção intracerebral

Para a administração intracerebral das drogas, o mandril foi gentilmente removido do interior da cânula. Com o intuito de garantir que o interior da cânula estivesse completamente livre de resíduos, uma lima odontológica de 13 mm de comprimento foi utilizada para a limpeza. Após esse procedimento, o animal foi colocado na caixa de condicionamento. Mantendo o animal livre, uma agulha de 16,2 mm (MCPd caudal) ou 16,45 mm (MCPd rostral) conectada a um tubo de polietileno (PE 10; Clay Adams, USA) e a uma microseringa (Hamilton, 5 μ l), foi gentilmente introduzida pela cânula.

Após a introdução da agulha na cânula guia, a superfície superior da caixa de condicionamento foi fechada. Deu-se o início à injeção com o auxílio de uma bomba de infusão (Insight®, Brasil modelo BI 2000). Em cada animal foi injetado um volume de 0,2 μ l de solução em uma taxa de infusão de 0,6 μ l/min, por 20 s. O deslocamento anterógrado de uma pequena bolha de ar no interior do polietileno assegurou a injeção do volume na MCPd.

3.5 Procedimentos experimentais

Todos os experimentos foram realizados durante a fase diurna, entre 12 e 18 h. Todas as sessões foram gravadas com auxílio de uma câmera (Logitech Webcam) instalada na sala de experimentação conectada diretamente a um microcomputador (Acer). Antes do início dos experimentos, os animais foram ambientados por pelo menos 20 min e após passarem pelo teste comportamental retornavam ao biotério sem contato com os animais que estavam na sala de ambientação. Cada animal foi utilizado apenas uma vez para cada protocolo experimental. Os animais receberam as injeções intracerebrais na caixa de condicionamento, posicionada dentro de uma capela de exaustão, com 20 μ l de odor eugenol 1% durante períodos de 10 ou 20 min.

3.5.1 Comportamentos analisados

Os dados comportamentais observados na sessão de condicionamento foram analisados minuto a minuto. Imobilidade, salto, corrida e recuo defensivo foram somados e classificados como comportamentos defensivos. Exploração vertical e horizontal (na posição vertical no centro da caixa ou com as patas dianteiras levantadas e apoiadas na caixa: representado pelo comportamento de levantar e na posição horizontal com as quatro patas no chão: representado por deambulação pela caixa em postura normal ou rastejando e contato nasal com os cantos da caixa) foram somadas e consideradas comportamento exploratório. O comportamento de auto-limpeza e *crouch sniffing* também foram avaliados, mas não foram classificados como os anteriores. Também foi obtida a distância percorrida.

Esses comportamentos foram registrados manualmente com auxílio do *software Anymaze®* (Wood Dale, U.S.A., Stoelting Co.). Nos dias de exposição à caixa de odor, o tempo no compartimento fechado, o tempo de aproximação à fonte de odor e o tempo de exploração do compartimento aberto com a cabeça, mantendo o corpo no interior do compartimento fechado (*head out*) foram avaliados manualmente.

3.5.2 Protocolo experimental

O protocolo experimental utilizado neste estudo foi adaptado de estudos do nosso laboratório (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ *et al.*, 2012; KROON e CAROBREZ, 2009). O delineamento experimental consistiu de três dias, onde dois ambientes experimentais distintos (Figura 2) foram utilizados para evitar a formação de uma memória contextual. A caixa de condicionamento (Figura 2A; Caixa A com 23 cm comprimento x 23 cm profundidade x 24 cm de altura) foi utilizada no primeiro dia de experimento, onde os ratos foram condicionados sob uma iluminação de intensidade 80 lux. Neste dia, os animais foram expostos ao odor de eugenol 1% como estímulo condicionado e receberam a microinjeção na MCPd como estímulo incondicionado.

A caixa de exposição ao odor (Figura 2B; Caixa B com 60 cm de comprimento x 26 cm de profundidade x 40 cm de altura) foi utilizada nos dois dias seguintes do protocolo experimental, denominados, dia de teste ao estímulo condicionado 1 (Teste EC1) com a presença de eugenol, e no dia de teste do estímulo condicionado 2

(Teste EC2), quando o animal foi reexposto ao contexto, sem a fonte de odor. Em ambas as sessões, a intensidade de luz durante foi de 4 lux.



Figura 2. Protocolo experimental utilizado. A) Caixa de condicionamento. B) Caixa de odor, com os compartimentos aberto e fechado. C) Caixa de odor sem a fonte de odor.

3.5.2.1 Experimento 1- Condicionamento olfatório aversivo – utilizando a injeção de NMDA na MCPd como EI

Para este experimento os animais foram divididos em dois grupos: PBS e NMDA na dose de 50 pmol. As análises foram feitas em duas etapas. Primeiro a sessão de condicionamento foi avaliada para verificar os comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCPd com NMDA. Posteriormente, para investigar o resultado da estimulação química da MCPd com NMDA sobre a estratégia comportamental, foram analisados os comportamentos exibidos durante a exposição ao EC (sessão EC1) e ao contexto associado (sessão EC2). A sessão de condicionamento teve duração de 10 min. A dose escolhida e o tempo da sessão de condicionamento nesta padronização foram baseados em experimentos pilotos e no estudo de Kincheski e colaboradores (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ *et al.*, 2012).

3.5.2.2 Experimento 2- Condicionamento olfatório aversivo - utilizando a injeção de bicuculina na MCPd como EI

Para este experimento foram utilizados dois tempos de sessão de condicionamento a fim de verificar as respostas defensivas induzidas pela bicuculina e avaliar se o tempo da sessão influencia na aquisição da memória olfatória aversiva. Uma sessão de condicionamento durou 10 min. A outra sessão teve duração de 20 min e para ambas, foram utilizados os seguintes tratamentos PBS, 20 pmol (10ng) e 40 pmol (20ng). Para analisar os efeitos da bicuculina no condicionamento, a escolha dos tempos pós-infusão foi fundamentado no estudo de Borelli e colaboradores (BORELLI, FERREIRA-NETTO *et al.*, 2005). Para verificar os comportamentos defensivos e exploratórios durante a

ativação da MCPd com bicuculina e posteriormente investigar o resultado dessa estimulação sobre a estratégia comportamental, as análises comportamentais foram realizadas da mesma forma como descrito acima para o grupo NMDA (pág 33).

3.6 Histologia

Após os testes comportamentais, os animais foram sacrificados com hidrato de cloral 15% (2,3 mg/kg, via IP). Para verificar a posição da agulha microinjetora cada animal (após eutanásia) passou por uma microinjeção de 0,2µl de corante Azul de Evans para marcar o sítio de injeção. Logo após os encéfalos foram coletados e mantidos em solução de paraformaldeído 10%. Posteriormente foi feita uma solução de sacarose 30% na qual os encéfalos foram transferidos e mantidos em geladeira por, no mínimo, 24h até serem cortados. Os cortes de 50µm foram obtidos com o criostato (CM1850; Leica, Alemanha) à -25°C e armazenados em lâminas de vidro gelatinizadas. As lâminas foram submetidas à coloração Giemsa e, a confirmação das injeções foi realizada com auxílio de um estereoscópio, utilizando o atlas de Paxinos e Watson (1998) para confirmar as estruturas atingidas. As fotomicrografias foram retiradas em microscópio de luz (Nikon – 8 Oi Eclipse).

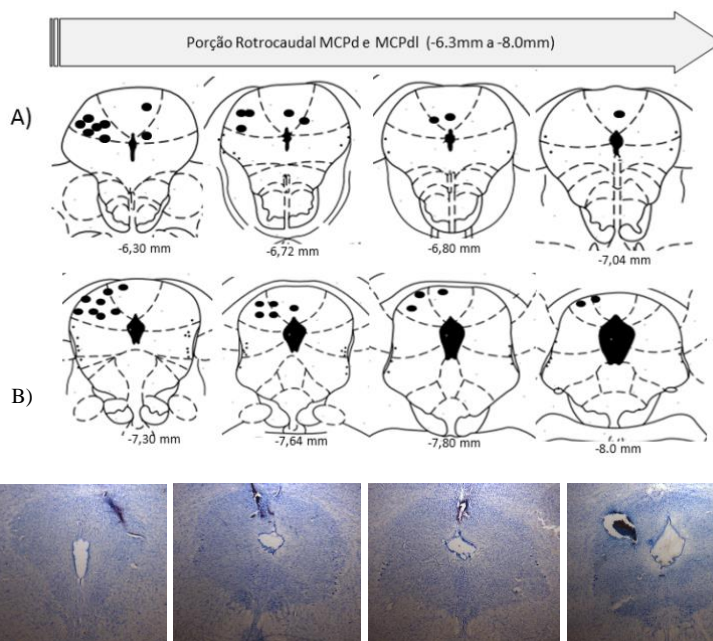


Figura 3. A) Diagrama esquemático de cortes coronais do encéfalo de rato mostrando a MCPd. Os círculos pretos indicam os locais das microinjeções, sendo que o número de círculos representados na figura é menor do que o número usado de animais. B) Fotomicrografias: corte coronal do encéfalo de ratos corados com Giemsa na região da MCPd, mostrando o local da microinjeção.

3.7 Análise estatística

Foram incluídos na análise estatística apenas os animais que tiveram os sítios de injeção marcados na MCPd e na MCPdl. A sigla MCPd foi utilizada no texto para designar tanto os animais que tiveram as injeções na MCPd quanto os que tiveram o sítio de injeção na MCPdl. Os resultados obtidos no presente trabalho foram analisados com auxílio do programa Statistica® (versão 6.0, Statsoft, Tulsa, EUA) e os gráficos foram preparados com auxílio do programa Prism 5.0 (GraphPad Prism®, San Diego, EUA).

A normalidade dos dados foi testada pelos testes Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, por serem dados considerados dentro da normalidade, para os comportamentos obtidos na sessão de condicionamento, foram aplicadas ANOVA de uma via. Para as sessões

de EC1 e EC2 foi aplicada uma ANOVA de medidas repetidas. O teste *post hoc* utilizado foi o de Newman-Keuls. Os dados foram expressos como média+ e.p.m. O valor de p considerado como significativo foi de $<0,05$. Valores de p entre 0,05 e 0,07 foram considerados tendências.

4. Resultados

4.1 Etapa 1- Condicionamento olfatório aversivo- utilizando a injeção de NMDA na MCPd como EI

4.1.1 Comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCPd com NMDA

A figura 4 mostra os comportamentos expressos pelos animais imediatamente após receberem 50 pmol de NMDA na MCPd durante a sessão de condicionamento de 10 min. Os dados foram divididos em comportamentos exploratórios que incluem exploração vertical e horizontal e comportamentos defensivos que incluem imobilidade, salto e fuga.

Com relação aos comportamentos exploratórios, a ANOVA detectou uma redução significativa [$F(1, 15)=7,3788$, $p=0,01593$] nos animais que receberam NMDA 50 pmol, quando comparados aos que foram microinjetados com PBS. Apesar da diferença visual, os dados do conjunto das respostas defensivas mostraram somente uma tendência a aumento nos ratos injetados com NMDA [$F(1, 15)=3,6823$, $p=0,07422$].

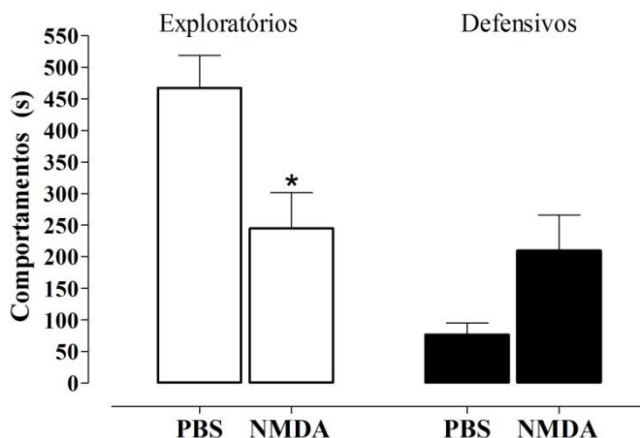


Figura 4. Efeito da microinjeção de NMDA no tempo gasto nos comportamentos exploratórios e comportamentos defensivos durante 10 min. Colunas representam a média + e.p.m. * $p<0.05$ teste de ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. PBS (n=12) e NMDA (n=10).

A Figura 5 (A) mostra os resultados minuto-a-minuto dos comportamentos defensivos para os grupos PBS e NMDA 50 pmol. A ANOVA mostrou uma tendência para o fator tratamento [$F(1,29)=4,17$, $p=0,05$], uma diferença para o fator tempo [$F(9,261)=3,08$; $p=0,001$] e um efeito da interação entre o tempo e o tratamento [$F(9,261)=4,38$, $p=0,00002$].

O teste *post hoc* mostrou que os comportamentos defensivos exibidos pelo grupo PBS no primeiro minuto da sessão de condicionamento é maior, comparado com os outros 9 minutos da sessão. Desta forma, foi observada uma redução significativa nos comportamentos defensivos ao longo do tempo ($p<0,0005$, para todos os minutos analisados), atingindo níveis de valores menores do que os do grupo NMDA. O teste *post hoc* não detectou diferenças entre os comportamentos defensivos exibidos pelo grupo NMDA ao longo dos 10 min da sessão de condicionamento ($p>0,05$). Desta forma, à exceção do primeiro minuto, os níveis de comportamentos defensivos exibidos pelos ratos do grupo NMDA permaneceram em níveis superiores aos do grupo controle durante toda sessão.

A Figura 5 (B) mostra os resultados minuto-a-minuto obtidos dos dados referentes a comportamentos exploratórios para os grupos PBS e NMDA 50 pmol. A ANOVA detectou diferença no tratamento [$F(1, 15)=7,3788$, $p=0,01593$], no tempo [$F(9, 135)=1,6733$, $p=0,10126$] e na interação entre o tempo e o tratamento [$F(9, 135)=4,0962$, $p=0,00011$].

O teste *post hoc* mostrou que os comportamentos exploratórios no primeiro minuto da sessão de condicionamento no grupo PBS são diferentes dos comportamentos exploratórios deste mesmo grupo no 3º ao 7º minuto ($p<0,05$) e no 10º minuto ($p<0,05$), assim, houve um aumento de comportamentos exploratórios com o passar do tempo da sessão de condicionamento.

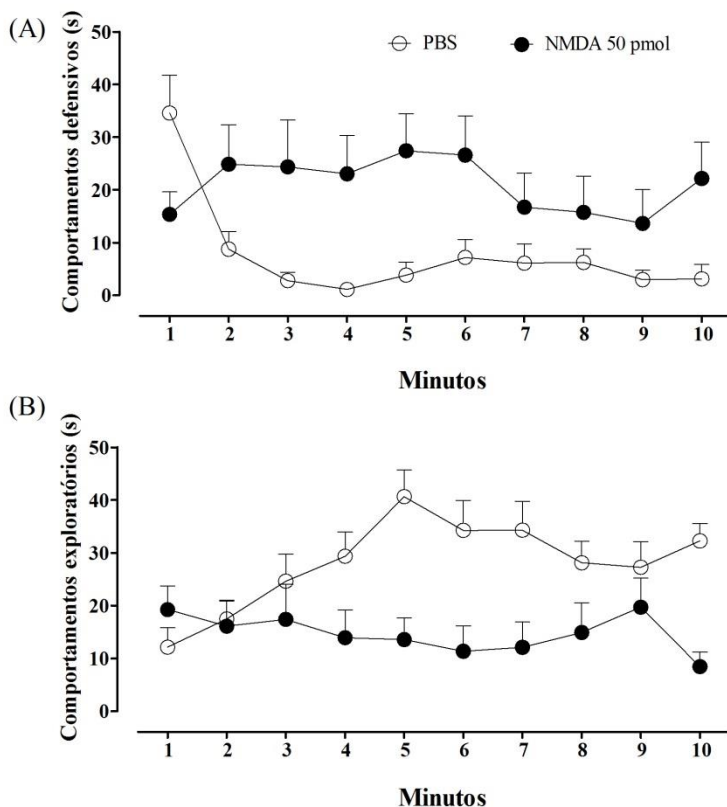


Figura 5. A. Avaliação minuto-a-minuto do tempo gasto em comportamentos defensivos exibidos por ratos imediatamente após receberem uma injeção de PBS (n=12) ou NMDA 50 pmol (n=10) na MCPd. Os pontos mostram a média + e.p.m. B. Avaliação minuto-a-minuto do tempo gasto em comportamentos exploratórios exibidos por ratos imediatamente após receberem uma injeção de PBS (n=12) ou NMDA 50 pmol (n=10) na MCPd.

Durante a sessão de condicionamento foi observado que ao longo do tempo o animal exibe comportamentos diferentes. Os comportamentos de fuga, quando existentes, são observados no início da sessão, o comportamento de auto-limpeza é mais evidente no final da sessão. Por este motivo, os comportamentos de fuga, *crouch-sniffing* e auto-limpeza foram analisados em dois blocos de 5 min cada, não

havendo diferença estatística entre os grupos PBS e NMDA (ANEXO-2, pg. 82).

A Figura 6 mostra os dados referentes à distância percorrida em metros, pelos animais que receberam microinjeções de PBS e 50 pmol de NMDA durante a sessão de condicionamento com 10 min de duração. A ANOVA detectou diferença entre os grupos PBS e NMDA, no tratamento [$F(1, 15)=24,004$, $p=0,00019$], não detectou diferença no tempo [$F(9, 135)=0,97009$, $p=0,46762$] e detectou diferença entre a interação entre tratamento e tempo [$F(9, 135)=4,1633$, $p=0,00009$].

O teste *post hoc* mostrou que para o grupo NMDA a distância percorrida no 10º minuto é significativamente menor do que a distância percorrida no 1º minuto ($p<0,0005$) no 5º ao 7º minuto ($p<0,05$) e no 9º minuto ($p<0,05$). Ainda a distância percorrida no 10º minuto pelos animais que receberam NMDA é significativamente menor do que a distância percorrida pelos animais do grupo PBS nos 2º ao 4º e 8º min ($p<0,05$).

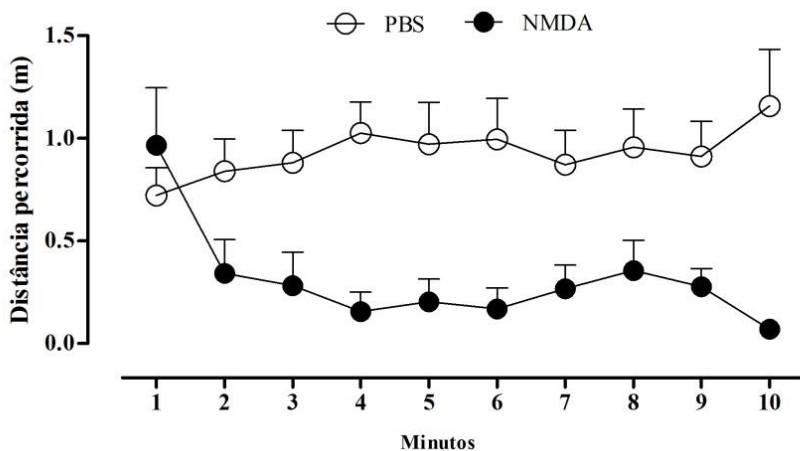


Figura 6. Distância percorrida durante a sessão de condicionamento (metros). Dados representam média + e.p.m. PBS (n =12) ou NMDA (n=10).

4.1.2 Estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com NMDA durante exposição ao EC e ao contexto associado

A Figura 7 mostra os dados obtidos nas sessões EC1 e EC2 nas quais foram avaliadas se houve a formação de uma memória olfatória aversiva. A existência do processo mnemônico foi inferida pela expressão dos comportamentos defensivos de tempo escondido, tempo de aproximação e *head out*, expressos em porcentagem. A ANOVA mostrou que o tratamento com NMDA teve efeito sobre o tempo escondido [$F(1,16)=11,4$, $p=0,003$], sobre o de tempo de aproximação [$F(1,16)=12,1$, $p=0,003$], e *head out* [$F(1,16)=13,9$, $p=0,001$].

O teste *post hoc* revelou que os animais tratados com NMDA 50 pmol, avaliados na sessão EC1, aumentaram o tempo escondido ($p<0,05$) comparado com o grupo PBS. O teste *post hoc* não mostrou diferença entre o tempo de aproximação dos animais que receberam NMDA 50 pmol, comparado aos animais que receberam PBS. Os animais pertencentes ao grupo NMDA 50 pmol reduziram o tempo de *head out* ($p<0,05$) quando comparados com o grupo PBS.

Na sessão de EC2, os animais tratados com 50 pmol de NMDA tiveram um maior tempo escondido com relação ao tempo escondido do grupo PBS ($p<0,05$). Em adição, os animais do grupo NMDA 50 pmol aumentaram o tempo escondido na sessão EC2, com relação ao tempo escondido durante a sessão EC1 ($p<0,05$). Os animais que receberam NMDA 50 pmol reduziram o tempo de aproximação, comparado ao grupo PBS ($p<0,05$). Os animais tratados com 50 pmol de NMDA reduziram o tempo de *head out* ($p<0,05$), comparado ao grupo PBS.

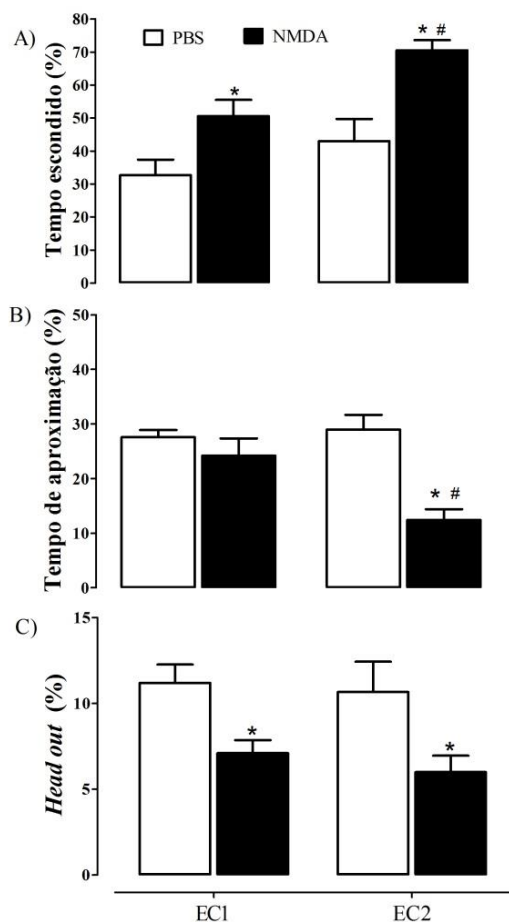


Figura 7: Efeito da microinjeção de 50 pmol de NMDA na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório e ao contexto. PBS (n=7) NMDA 50 pmol (n=10). Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa a expressão durante a exposição ao contexto, no qual o EC foi retirado. As barras verticais representam média + e.p.m. (A) Tempo escondido, (B) tempo de aproximação e (C) tempo de head out. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparando as sessões de EC1 e EC2 no mesmo grupo; (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* de Newman-Keuls) PBS (n =7) ou NMDA (n=10).

A figura 8 mostra os dados obtidos com a microinjeção de 50 pmol de NMDA ou PBS na estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2. O fato da sessão de familiarização ter sido abolida possibilitou que a estratégia comportamental adotada pelos animais na caixa de odor fosse avaliada minuto-a-minuto. Após esta primeira análise, conseguimos detectar que a mudança na expressão dos comportamentos ocorreu apenas após o 3º minuto da sessão de EC1. Devido a isso, os resultados foram separados em três momentos. A sessão de EC1 foi dividida em duas partes, os três primeiros minutos (parte I) e os dois últimos minutos (parte II). Durante a sessão EC2, os resultados foram analisados pelos dos dados agrupados de 5 min (parte III).

Para o tempo escondido, a ANOVA detectou efeito significativo do tratamento entre os grupos PBS e NMDA 50 pmol, $[F(1, 16)=8,3837, p=0,01054]$, e também detectou efeito no tempo $[F(2, 32)=7,3427, p=0,00237]$, além de um efeito entre a interação do tempo e do tratamento $[F(2, 32)=3,6255, p=0,03809]$. O teste *post hoc* mostrou que em relação aos três momentos analisados, houve um aumento no tempo escondido nos dois últimos minutos da sessão de EC1, comparado aos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,05$) (figura 8 A). O teste *post hoc* detectou também um aumento do tempo escondido na sessão EC2, comparado com o tempo escondido nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,0005$). O teste *post hoc* mostrou que a estratégia comportamental do grupo PBS com relação ao tempo escondido não mudou ao longo do tempo (figura 8A). O tempo escondido do grupo PBS na sessão EC2 não aumentou quando comparado ao tempo escondido nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p>0,05$). O tempo escondido na sessão de EC2, comparado com o tempo escondido nos dois últimos minutos da sessão EC1, também não difere entre si ($p>0,05$). Entretanto, a estratégia comportamental observada para o grupo NMDA 50 pmol, avaliada pelo teste *post hoc* mostrou uma diferença significativa entre os três primeiros minutos da sessão de EC1, comparado ao tempo escondido nos dois últimos minutos da sessão EC1 ($p<0,05$). O tempo escondido na sessão EC2 também se mostrou significativamente maior do que o tempo escondido observado nos três primeiros minutos na sessão EC1 ($p<0,0005$). Porém, ao comparar o tempo escondido nos dois últimos minutos da sessão de EC1 do grupo NMDA com o tempo escondido na sessão de EC2, também do grupo NMDA, ambos não diferiram entre si ($p>0,05$). O teste *post hoc* também revelou que o tempo escondido na sessão de EC2

nos animais que receberam NMDA 50 pmol é significativamente maior do que o tempo escondido na sessão EC1, nos três primeiros minutos ($p<0,005$) e nos dois últimos minutos ($p<0,005$) do grupo PBS. O tempo escondido nos dois últimos minutos na sessão de EC1 nos animais que receberam NMDA 50 pmol é significativamente maior do que o tempo escondido nos animais que receberam PBS nos três primeiros minutos da sessão EC1.

Na estratégia comportamental referente ao tempo de aproximação, uma diferença entre os tratamentos PBS e 50 pmol de NMDA, foi mostrada pela ANOVA, [$F(1, 16)=8,1254$, $p=0,01157$]. A ANOVA também detectou diferenças no tempo [$F(2, 32)=3,4842$, $p=0,04276$], porém não houve diferença na interação entre o tratamento e o tempo [$F(2, 32)=2,9055$, $p=0,06926$]. O teste *post hoc* mostrou uma redução significativa no tempo de aproximação para o grupo NMDA na sessão EC2, comparados com ele mesmo nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,005$) (figura 8B), o tempo de aproximação dos três primeiros minutos da sessão EC1 não diferiu do tempo de aproximação dos dois últimos minutos na sessão de EC1 nem para os animais tratados com PBS nem nos animais tratados com NMDA 50 pmol ($p>0,05$). Em virtude da tendência verificada na interação do tratamento com o tempo, foi feito o teste de *post hoc*. O teste *post hoc* revelou uma diferença significativa entre o tempo de aproximação na sessão EC2 do grupo PBS, comparado com o tempo de aproximação da sessão de EC2 do grupo tratado com 50 pmol de NMDA ($p<0,05$). O teste *post hoc* também revelou que o tempo de aproximação na sessão de EC2 do grupo NMDA 50 pmol é menor que o tempo de aproximação nos três primeiros minutos da sessão de EC1 no mesmo grupo ($p<0,05$).

Na estratégia comportamental referente ao tempo de *head out*, a ANOVA detectou efeito para o tratamento [$F(1, 16)=6,0689$, $p=0,02547$], no tempo [$F(2, 32)=17,393$, $p=0,00001$] e na interação entre o tratamento e o tempo [$F(2, 32)=3,8406$, $p=0,03199$]. O teste *post hoc* mostrou que o tempo de *head out* no grupo PBS é maior na sessão de EC2, comparado com três primeiros minutos da sessão de EC1 dentro do mesmo grupo ($p<0,0005$). O tempo de *head out* na sessão de EC2 do grupo PBS é maior quando comparado com o tempo de *head out* do grupo que recebeu NMDA 50 pmol também na sessão de EC2 ($p<0,0005$).

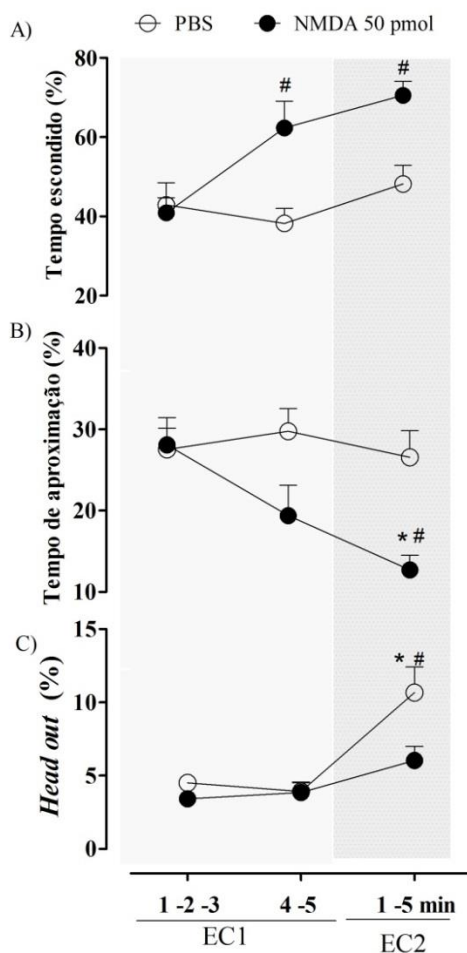


Figura 8: Efeito da microinjeção de NMDA na estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2. Os dados representam a média \pm e.p.m dos 1º, 2º e 3º minutos da sessão EC1, 4º e 5º minutos da sessão EC1 e o último ponto destacado em cinza representa a sessão de EC2 média \pm e.p.m dos 5 minutos da sessão. (A) Tempo escondido, (B) tempo de aproximação e (C) tempo de *head out*. * $p < 0,05$ comparado ao grupo PBS. # $p < 0,05$ comparado ao mesmo grupo durante o intervalo de 1º 2º e 3º minuto da sessão de EC1. ANOVA de medidas repetidas seguido pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. PBS (n=7) ou NMDA (n=10).

4.2 Etapa 2- Condicionamento olfatório aversivo- utilizando a injeção de bicuculina na MCPd como EI

4.2.1 Comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCPd com bicuculina

A figura 9 mostra os resultados obtidos durante a sessão de condicionamento de 10 min para os comportamentos exploratórios e defensivos. A ANOVA verificou um efeito do tratamento nos comportamentos exploratórios [$F(2,19)=7,59$ $p=0,0037$] e o teste *post hoc* revelou que houve redução significativa destes comportamentos para ambas as doses avaliadas (20 pmol e 40 pmol de bicuculina). Para os comportamentos defensivos foi verificado um efeito do tratamento [$F(2, 32)=3,9561$, $p=0,02915$] e o teste *post hoc* mostrou um aumento dos comportamentos defensivos apenas nos animais que receberam a dose de 40 pmol.

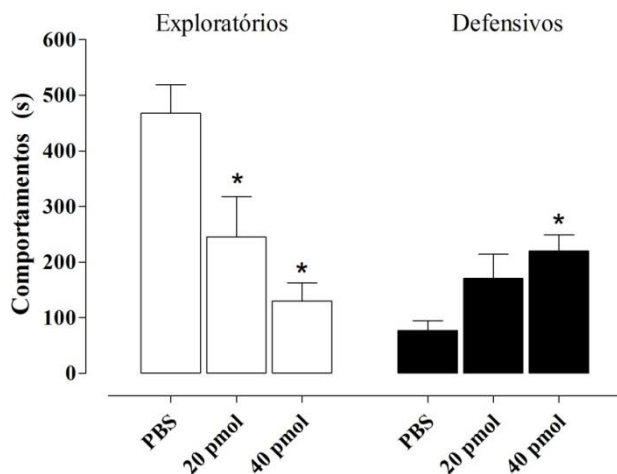


Figura 9: Efeito da microinjeção de bicuculina no tempo gasto nos comportamentos exploratórios e comportamentos defensivos durante 10 min. Colunas representam a média + e.p.m. * $p<0.05$ teste de ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* Newman-Keuls. PBS (n=12), bicuculina 20 pmol (n=8) e bicuculina 40 pmol (n=20).

A figura 10 mostra os resultados obtidos durante a sessão de condicionamento de 20 minutos para os comportamentos exploratórios e defensivos. A ANOVA detectou efeito do tratamento nos comportamentos exploratórios [$F(2, 32)=11,537$, $p=0,00017$] e o teste *post hoc* revelou que houve redução significativa desses comportamentos nos animais que receberam a dose de 20 pmol ($p<0,05$) e a dose de 40 pmol ($p<0,0005$) de bicuculina. A ANOVA também detectou efeito do tratamento para os comportamentos defensivos [$F(2, 32)=4,3305$, $p=0,02165$] e o teste *post hoc* mostrou um aumento significativo desses comportamentos nos animais que receberam a dose de 40 pmol ($p<0,05$) de bicuculina.

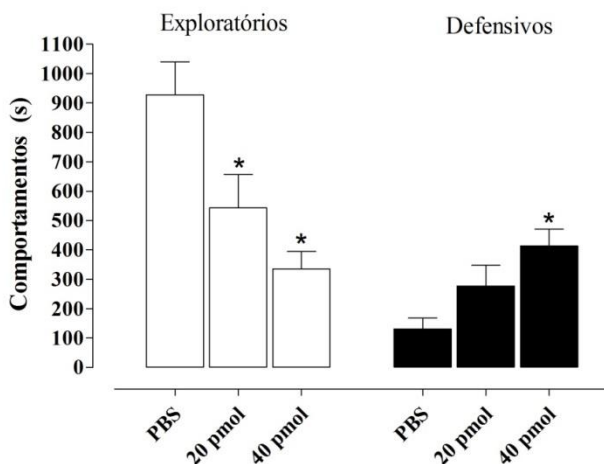


Figura 10: Efeito da microinjeção de bicuculina no tempo gasto nos comportamentos exploratórios e comportamentos defensivos durante 20 min. Colunas representam a média + e.p.m. * $p<0.05$ teste de ANOVA de uma via seguido pelo *post hoc* Newman-Keuls. PBS ($n=7$), bicuculina 20 pmol ($n=8$) e bicuculina 40 pmol ($n=20$).

Os comportamentos avaliados minuto-a-minuto são mostrados em gráficos de 20 min e incluem os dados referentes aos animais condicionados por 10 min. A figura 11 (A) mostra os resultados minuto-a-minuto dos comportamentos defensivos para os grupos PBS e bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol. A ANOVA mostrou uma diferença entre os comportamentos defensivos exibidos para os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 32)=4,3305$,

$p=0,02165$]. O teste *post hoc* mostrou que os comportamentos defensivos exibidos pelo grupo bicuculina 40 pmol é maior do que os comportamentos defensivos exibidos pelo grupo PBS e bicuculina 20 pmol.

A ANOVA detectou uma tendência para o tempo [$F(19, 608)=1,5411$, $p=0,06606$] e detectou um efeito entre da interação entre o tempo e o tratamento [$F(38, 608)=1,4861$, $p=0,03264$]. O teste *post hoc* revelou que os comportamentos defensivos exibidos pelo grupo PBS reduzem significativamente ao longo do tempo ($p<0,05$).

A Figura 11 (B) mostra os resultados obtidos minuto-a-minuto dos comportamentos exploratórios para os grupos PBS e bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol. A ANOVA detectou diferença entre os tratamentos [$F(2, 32)=11,537$, $p=0,00017$] e o teste *post hoc* mostrou que a porcentagem de comportamentos exploratórios é significativamente menor nos animais tratados com bicuculina 20 pmol e com bicuculina 40 pmol comparados com os comportamentos exploratórios expressos pelo grupo PBS. A ANOVA não mostrou diferenças significativas ao longo do tempo [$F(19, 608)=1,4575$, $p=0,09446$], mas detectou diferença na interação entre o tempo e o tratamento [$F(38, 608)=2,0128$, $p=0,00040$] porém essas diferenças entre os pontos não se mostraram relevantes.

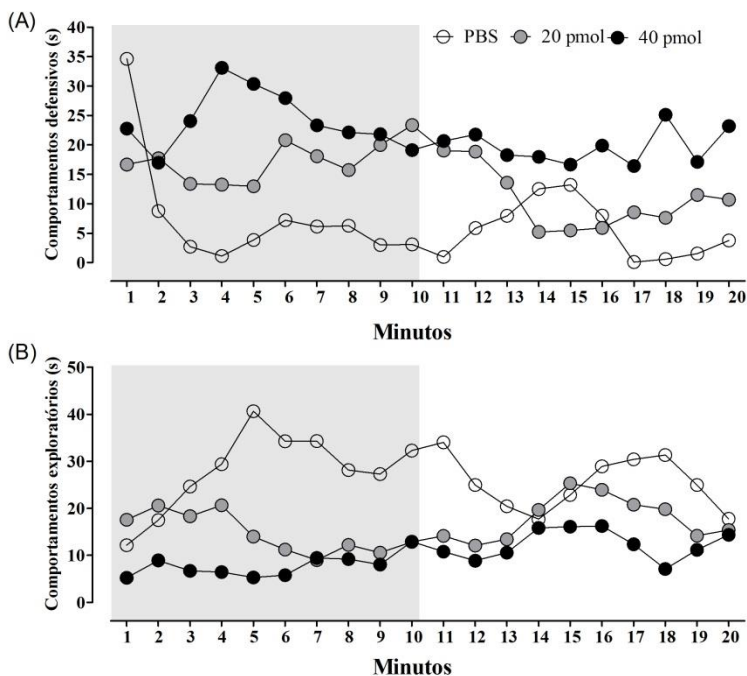


Figura 11: A. Avaliação minuto-a-minuto no tempo gasto em comportamentos defensivos exibidos por ratos imediatamente após receberem uma injeção de PBS (n=7), bicuculina 20 pmol (n=8) e bicuculina 40 pmol (n=20) na MCPd. Os pontos mostram a média. B. Avaliação minuto-a-minuto do tempo gasto em comportamentos exploratórios exibidos por ratos imediatamente após receberem uma injeção de PBS (n=7), bicuculina 20 pmol (n=8) e bicuculina 40 pmol (n=20) na MCPd.

Durante a sessão de condicionamento, independente do tratamento, os animais exibiram diferentes comportamentos alternados ao longo da sessão. Por esse motivo, a sessão de condicionamento de 20 min foi dividida em três partes. Os comportamentos de fuga, *crouching* e auto-limpeza foram analisados separadamente para os primeiros 5 min da sessão (parte I), 5 min seguintes (parte II) e tempo restante da sessão (parte III).

Durante a sessão de condicionamento foi observado comportamento de fuga em 12 dos 20 animais injetados com a dose de 40 pmol de bicuculina, sendo que desses, 6 animais sustentaram a fuga até o 11º minuto. A fuga na parte I da sessão de condicionamento para

os animais injetados com 40 pmol foi de 8,87%, passando para 5,44% na parte II da sessão de condicionamento e foi reduzida para 0,59% na parte III da sessão (Tabela 1). Dos 8 animais que receberam a dose de 20 pmol de bicuculina, 3 animais exibiram fuga e em 1 animal esta fuga permaneceu sustentada até o 8º minuto.

Tabela 1. Fuga observada durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min %)	Parte II (6-10 min %)	Parte III (11-20 min %)
Controle (PBS)	0	0	0
Bicuculina (20 pmol)	0,51±0,43	0,13±0,13	0
Bicuculina (40 pmol)	8,87±3,38	5,44±2,28	0,59±0,27

A tabela 2 mostra o comportamento de recuo defensivo durante a sessão de condicionamento, observado apenas quando a injeção foi localizada na porção rostral da MCPd. Na parte I da sessão de condicionamento apenas os animais pertencentes ao grupo bicuculina 40 pmol apresentaram 4,68 % deste comportamento. Na parte II da sessão de condicionamento o recuo defensivo dos animais tratados com bicuculina 40 pmol foi de 2,20 %. Não foi observado este comportamento em nenhum dos outros grupos.

Tabela 2. Comportamento de recuo defensivo observado durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min%)	Parte II (6-10 min%)	Parte III (11-20 min%)
Controle (PBS)	0	0	0
Bicuculina (20 pmol)	0	0	0
Bicuculina (40 pmol)	4,68±3,41	2,20±1,91	0

Na tabela 3 pode-se observar o comportamento de auto-limpeza dos animais durante a sessão de condicionamento. A ANOVA não detectou diferença significativa entre os tratamentos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol no comportamento de auto-limpeza [F(2, 32)=1,6000, p=0,21762]. A ANOVA detectou uma diferença ao longo do tempo [F(2, 64)=10,103, p=0,00015] e uma interação do tratamento com o tempo [F(4, 64)=3,6148, p=0,01018].

Tabela 3. Comportamento de auto-limpeza observado durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min%)	Parte II (6-10 min%)	Parte III (11-20 min%)
Controle (PBS)	7,32±1,14	9,68 ± 0,89	7,9 ± 1,77
Bicuculina (20 pmol)	0,85 ± ,63	3,65 ± 1,98	10,23±1,28
Bicuculina (40 pmol)	0,92±0,52	3,60 ± 1,38	11,63±2,82

A tabela 4 mostra o comportamento de *crouch sniffing*. A ANOVA não mostrou diferença entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 32)=,44728$, $p=0,64330$]. A ANOVA não mostrou diferenças ao longo do tempo [$F(2, 64)=1,6159$, $p=0,20671$]. Ainda, não houve diferenças na interação do tratamento com o tempo [$F(4, 64)=1,3776$, $p=0,25163$] (Tabela 4).

Tabela 4. Comportamento de *crouch sniffing* observado durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min%)	Parte II (6-10 min%)	Parte III (11-20 min%)
Controle (PBS)	9,75 ± 1,52	9,67 ± 2,13	5,81 ± 1,67
Bicuculina (20 pmol)	5,09 ± 1,18	12,56 ± 5,67	7,71 ± 1,51
Bicuculina (40 pmol)	6,90 ± 1,78	6,31 ± 1,62	5,84 ± 0,84

A distância percorrida pelos animais que receberam PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol, no dia do condicionamento é mostrada na figura 12. A ANOVA de vias repetidas não detectou diferenças entre os tratamento [$F(2, 32)=1,2322$, $p=0,30513$], mas detectou diferenças para o tempo [$F(19, 608)=2,7509$, $p=0,00010$] e na interação entre o tempo e o tratamento [$F(38, 608)=1,9964$, $p=0,00047$]. O teste *post hoc* mostrou que a distância percorrida pelos animais que receberam a dose de 40 pmol, é maior nos 3 primeiros minutos da sessão, quando comparado com a distância percorrida no resto da sessão do mesmo grupo ($p<0,05$). A distância percorrida pelo grupo PBS ao longo da sessão não apresenta diferenças ($p>0,05$) e os animais tratados com bicuculina 20 pmol também não apresentam diferenças com relação à distância percorrida ao longo da sessão.

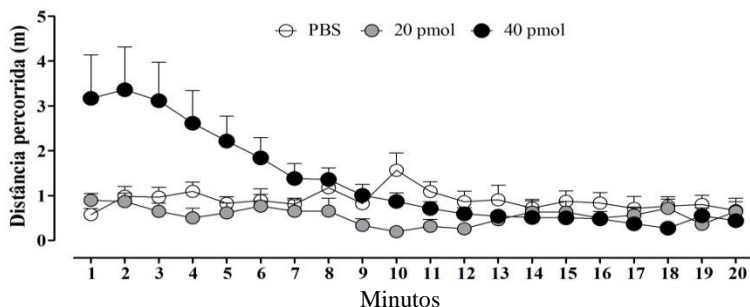


Figura 12: Distância percorrida durante a sessão de condicionamento (metros). Dados representam a média + e.p.m (PBS= 7), bicuculina 20 pmol (n=8) e bicuculina 40 pmol (n=20).

4.2.2 Estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com bicuculina durante exposição ao EC e ao contexto associado – animais condicionados por 10 min

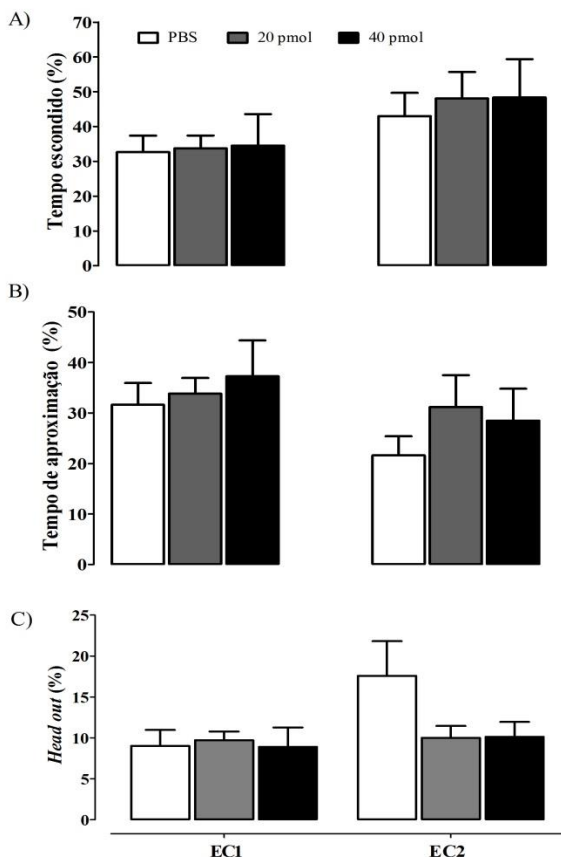
A figura 13 mostra o efeito da microinjeção de PBS, 20 e 40 pmol de bicuculina na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório nos animais condicionados por 10 min.

Para o tempo escondido, a ANOVA não detectou diferença significativa entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 28)=0,10114$, $p=0,90413$], porém detectou diferença para o fator tempo [$F(1, 28)=17,892$, $p=0,00023$], o teste *post hoc* mostrou um aumento no tempo escondido na sessão EC2, comparado com o tempo escondido na sessão EC1. A ANOVA não detectou diferença no fator interação entre o tempo e o tratamento [$F(2, 28)=0,21223$, $p=0,81007$].

Para o tempo de aproximação, a ANOVA, não detectou diferença entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=1,0734$, $p=0,35197$]. A ANOVA detectou efeito para o tempo [$F(1, 38)=11,547$, $p=0,00161$] e o teste *post hoc* mostrou uma redução no tempo de aproximação na sessão EC2, comparado com o tempo de aproximação da sessão EC1. A ANOVA não detectou diferenças na interação entre o tempo e o tratamento [$F(2, 38)=0,98496$, $p=0,38279$].

Para o tempo de *head out*, a ANOVA não detectou diferença entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=0,73700$, $p=0,48526$]. A ANOVA também não mostrou diferenças

no tempo [$F(1, 38)=0,23649$, $p=0,62955$] nem na interação entre tempo e o tratamento [$F(2, 38)=0,47996$, $p=0,62251$].



A Figura 13: Efeito da microinjeção de 20 e 40 pmol de bicuculina na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório e ao contexto. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa a expressão durante a exposição ao contexto, no qual o EC foi retirado. As barras verticais representam média + e.p.m. (A) Tempo escondido, (B) tempo de aproximação à fonte de odor e (C) tempo de *head out*. * $p<0,05$ comparado com o grupo controle. # $p<0,05$ comparando as sessões EC1 e EC2 no mesmo grupo; (ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* de Newman-Keuls). PBS (n=14) bicuculina 20 pmol (n=10) bicuculina 40 pmol (n=7). Sessão de condicionamento de 10 min.

A figura 14 mostra os dados obtidos com a microinjeção de PBS, 20 e 40 pmol de bicuculina na estratégia comportamental observada nas sessões EC1 e EC2 para os animais que foram condicionados por 10 min.

Para o tempo escondido a ANOVA de medidas repetidas não detectou efeito significativo no tratamento entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 28)=0,03529$, $p=0,96536$]. Porém, detectou efeito no tempo [$F(2, 56)=10,272$, $p=0,00016$] e o teste *post hoc* revelou que na sessão de EC2 há um aumento no tempo escondido, comparado com o tempo escondido nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p=0,0001$), o tempo escondido na sessão de EC2 também mostrou-se maior quando comparado com o tempo escondido nos dois últimos minutos da sessão EC1 ($p=0,008$), mostrando desta forma que, independente do tratamento, os animais aumentam o tempo escondido na sessão EC2, comparado com a sessão EC1. A ANOVA de medidas repetidas não mostrou diferença significativa na interação entre tratamento e tempo [$F(4, 56)=1,8854$, $p=0,12572$].

Para o tempo de aproximação, a ANOVA não detectou diferença no tratamento entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 28)=0,72801$, $p=0,49179$], mas detectou diferença no tempo [$F(2, 56)=3,2452$, $p=0,04640$], no qual o teste *post hoc* mostrou uma redução significativa no tempo de aproximação na sessão EC2, comparado com o tempo de aproximação nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,05$). Entretanto o tempo de aproximação na sessão de EC2 não difere do tempo de aproximação nos dois últimos minutos da sessão EC1. Não foram detectadas diferenças na interação entre o tratamento e o tempo [$F(4, 56)=1,1288$, $p=0,35231$].

Para o tempo de *head out*, a ANOVA não detectou diferença no tratamento entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 28)=1,0300$, $p=0,37014$]. Porém, detectou efeito no tempo [$F(2, 56)=19,665$, $p=0,00000$] e o teste *post hoc* mostrou que o tempo de *head out* é menor nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,005$), comparado com o tempo de *head out* na sessão de EC2 e também, que o tempo de *head out* é menor nos dois últimos minutos da sessão EC1 ($p<0,005$) comparado com o tempo de *head out* na sessão de EC2, independente do tratamento. A ANOVA de medidas repetidas não

detectou efeito na interação entre tratamento e o tempo [$F(4, 56)=1,9082$, $p=0,12177$].

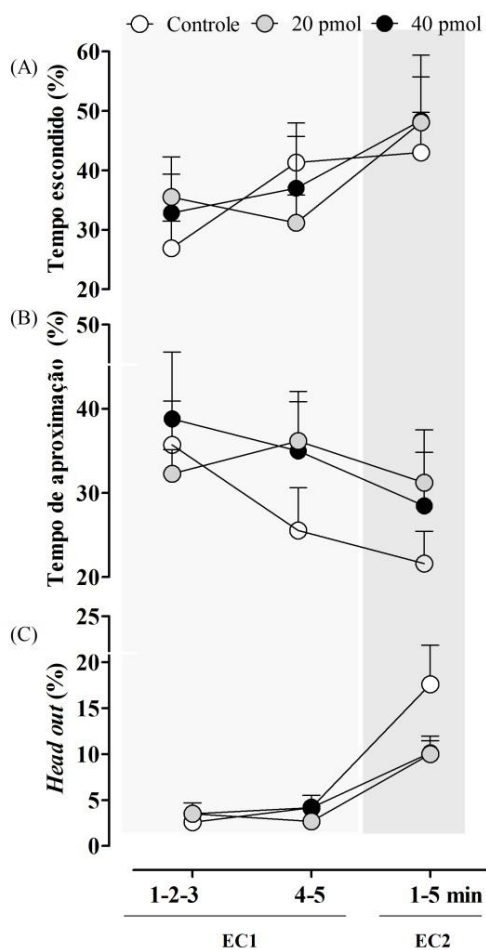


Figura 14: Efeito da microinjeção de bicuculina na estratégia comportamental observada nas sessões EC1 e EC2. Os dados representam a média + e.p.m dos 1º, 2º e 3º minutos da sessão EC1, 4º e 5º minuto da sessão EC1 e o ultimo ponto destacado em cinza representa a sessão de EC2 média ± e.p.m dos 5 minutos da sessão. (A) Tempo escondido, (B) tempo de aproximação e (C) tempo de *head out*. ANOVA de medidas repetidas seguido pelo *post hoc* de Newman-Keuls. PBS (n=14) bicuculina 20 pmol (n=10) bicuculina 40 pmol (n=7). Sessão de condicionamento de 10 min.

4.2.3 Estratégia comportamental no condicionamento olfatório aversivo utilizando a estimulação química da MCPd com bicuculina durante exposição ao EC e ao contexto associado– animais condicionados por 20 min

A figura 15 mostra o efeito da microinjeção de 20 e 40 pmol de bicuculina na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório. A ANOVA não detectou diferença significativa no tempo escondido entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=1,2385$, $p=0,30124$], porém, detectou diferença no tempo [$F(1, 38)=11,653$, $p=0,00154$] e o *post hoc* mostrou um aumento no tempo escondido na sessão EC2, comparado com o tempo escondido na sessão EC1 ($p<0,0005$), independente do tratamento. A ANOVA não detectou diferença na interação entre tempo e o tratamento [$F(2, 38)=0,02476$, $p=0,97556$].

Para o tempo de aproximação, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=1,0734$, $p=0,35197$]. Porém, detectou diferenças no tempo [$F(1, 38)=11,547$, $p=0,00161$] e o teste *post hoc* revelou que houve uma redução no tempo de aproximação na sessão EC2, comparado com o tempo de aproximação na sessão EC1 independente do tratamento. A ANOVA não detectou diferenças na interação entre o tratamento e o tempo [$F(2, 38)=0,98496$, $p=0,38279$].

Para o tempo de *head out*, a ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=,73700$, $p=0,48526$]. A ANOVA não detectou diferenças no tempo [$F(1, 38)=0,23649$, $p=0,62955$] e também não foram detectadas diferenças significativas na interação entre o tratamento e o tempo [$F(2, 38)=0,47996$, $p=0,62251$].

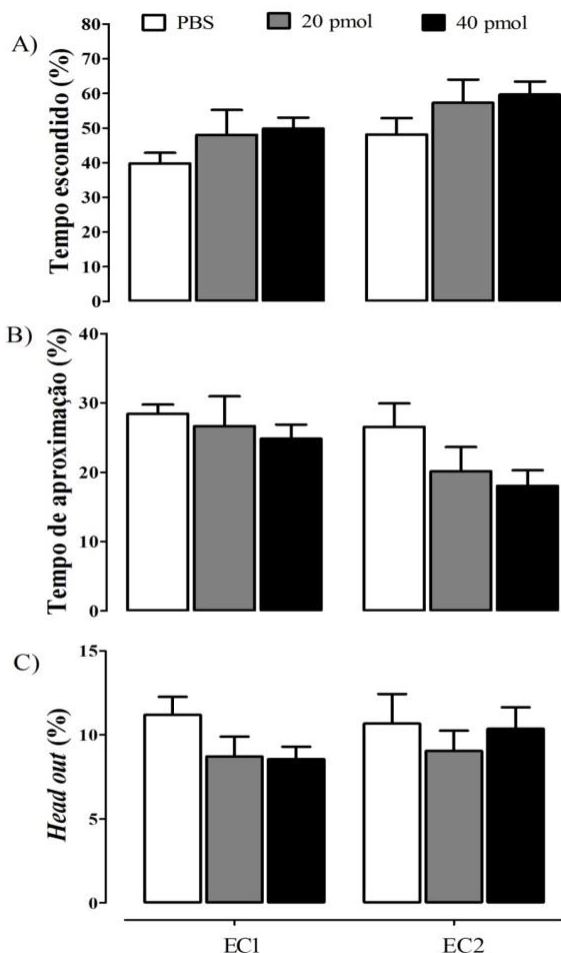


Figura 15: Efeito da microinjeção de 20 e 40 pmol de bicuculina na expressão do comportamento defensivo ao estímulo condicionado olfatório e ao contexto. Teste EC1 representa a exposição ao EC na caixa de odor e o teste EC2 representa a expressão durante a exposição ao contexto, no qual o EC foi retirado. As barras verticais representam a média + e.p.m. (A) Tempo escondido, (B) tempo de aproximação à fonte de odor e (C) tempo de head out. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle. # $p < 0,05$ comparando as sessões de EC1 e EC2 no mesmo grupo; (ANOVA de medidas repetidas, post hoc de Newman-Keuls). PBS (n=7) bicuculina 20 pmol (n=10) bicuculina 40 pmol (n=24). Sessão de condicionamento de 20 min.

A figura 16 mostra a estratégia comportamental adotada pelos animais nas sessões EC1 e EC2 que foram condicionados por 20 min. Para o tempo escondido a ANOVA de medidas repetidas não detectou efeito significativo entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=1,2055$, $p=0,31073$]. Porém, a ANOVA detectou um efeito no tempo [$F(2, 76)=7,6497$, $p=0,00094$] e o teste *post hoc* mostrou um aumento no tempo escondido na sessão de EC2, comparado com o tempo escondido nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,0005$), além de um maior tempo escondido na sessão EC2, comparado com os dois últimos minutos da sessão EC1 ($p<0,0005$) independente do tratamento. Não foi detectada diferença na interação entre o tratamento e o tempo [$F(4, 76)=0,05768$, $p=0,99370$].

Para o tempo de aproximação, a ANOVA de medidas repetidas não detectou diferença entre os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=0,76177$, $p=0,47384$]. A ANOVA detectou um efeito no tempo [$F(2, 76)=6,3907$, $p=0,00272$] e o teste *post hoc* mostrou uma redução no tempo de aproximação na sessão EC2, comparado com o tempo de aproximação nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,05$), além de uma redução no tempo de aproximação na sessão EC2, comparado com o tempo de aproximação nos dois últimos minutos da sessão EC1 ($p<0,05$), independente do tratamento. A ANOVA não mostrou diferenças na interação entre o tratamento e o tempo [$F(4, 76)=0,63170$, $p=0,64140$].

A ANOVA não detectou diferenças para o tempo de *head out* para os grupos PBS, bicuculina 20 pmol e bicuculina 40 pmol [$F(2, 38)=0,05186$, $p=0,94953$]. A ANOVA detectou diferenças no tempo [$F(2, 76)=28,434$, $p=0,00000$] e o teste *post hoc* mostrou um aumento no tempo de *head out* na sessão EC2, quando comparado com o tempo de *head out* nos três primeiros minutos da sessão EC1 ($p<0,0005$), e um aumento no tempo de *head out* na sessão de EC2, comparado com o tempo de *head out* nos dois últimos minutos da sessão EC1 ($p<0,0005$), independente do tratamento. A ANOVA não detectou diferenças na interação entre o tratamento e o tempo [$F(4, 76)=0,64637$, $p=0,63115$].

Além dos animais que tiveram acertos na MCPd e receberam a microinjeção de bicuculina, alguns animais tiveram acerto no cóliculo (superior ou inferior), estes dados não foram discutidos no presente trabalho, mas pelo fato da literatura destacar a importância do cóliculo nas respostas de defesa (BRANDÃO, BORELLI, *et al.*, 2005; BRANDÃO, CARDOSO, *et al.*, 1994) os resultados obtidos no presente

estudo com relação a essas duas estruturas encontram-se no Anexo 3, pg 84. Também foram anexados os valores dos animais considerados o grupo *out* (Anexo 4, pg 87), ou seja, fora da MCPd e dos colículos superior e inferior.

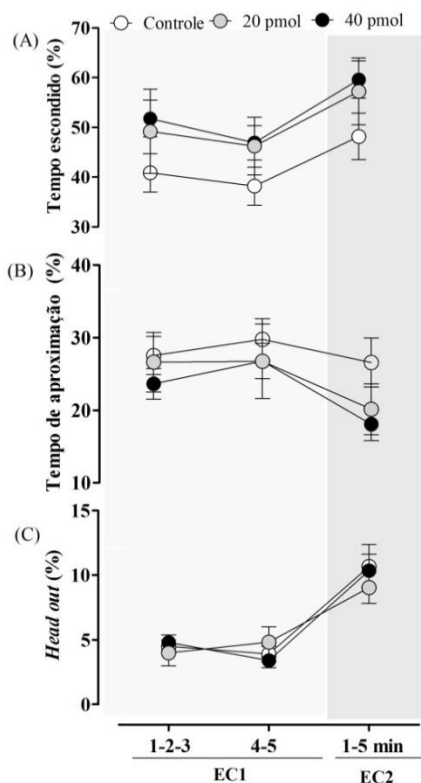


Figura 16: Efeito da microinjeção de bicuculina na estratégia comportamental observada nas sessões EC1 e EC2. Os dados representam a média + e.p.m dos 1º, 2º e 3º minutos da sessão EC1, 4º e 5º minuto da sessão EC1 e o último ponto destacado em cinza representa a sessão de EC2 média ± e.p.m dos 5 minutos da sessão. (A) Tempo escondido, (B) tempo de aproximação e (C) tempo de head out. ANOVA de medidas repetidas seguido pelo post hoc de Newman-Keuls. PBS (n=7) bicuculina 20 pmol (n=8) bicuculina 40 pmol (n=20). Sessão de condicionamento de 20 min.

5. Discussão

Trabalhos da década de 80 já mostravam que a estimulação elétrica e/ou química da MCP era capaz de produzir comportamentos defensivos expressos durante a estimulação ou a partir do efeito da droga e que, dependendo da intensidade do estímulo, a amplitude desses comportamentos poderia variar desde o congelamento até respostas galope, interpretada como fuga (GRAEFF, BRANDÃO, *et al.*, 1986; DI SCALA e SANDNER, 1989).

Sabe-se que a estratégia comportamental escolhida por um roedor depende da condição ambiental/ experimental na qual ele se encontra. Um breve exemplo é quando um rato é exposto a um gato. Se existe a possibilidade de escapar, ele exibirá o comportamento de fuga. Contudo, se existe um compartimento onde o animal pode se esconder, mas previamente ele foi punido com um choque, a sua estratégia comportamental poderá ser alterada para uma resposta mais adequada de congelamento (BLANCHARD e BLANCHARD, 1971).

Desta forma, para responder à hipótese de que o bloqueio de receptores GABA_A promoveria respostas de defesa, que levariam a um processo de aprendizagem no condicionamento olfatório aversivo, este trabalho avaliou dois momentos do protocolo de condicionamento olfatório aversivo: a aquisição de uma memória aversiva e, durante este processo a expressão de comportamentos de defesa clássicos devido à estimulação da MCPd. E em um segundo momento, a expressão de respostas de defesa ao EC. Inicialmente, para promover o condicionamento, o caráter motivacional aversivo evocado pela estimulação da MCPd foi obtido pela microinjeção de NMDA e bicuculina. Em decorrência disso, dois grupos de experimentos foram delineados: A) uma padronização do modelo experimental, utilizando a microinjeção de NMDA como EI; e B) uma investigação dos efeitos da microinjeção de bicuculina como EI.

Efeito do NMDA

O teste do condicionamento olfatório aversivo, padronizado por Kincheski e colaboradores, mostrou que animais que recebem doses crescentes de NMDA (25, 50, 100 e 200 pmol) na MCPdl apresentam durante a sessão de condicionamento, aumento de comportamentos defensivos, quando comparados com o grupo PBS. Estes animais apresentam aumento do tempo de congelamento e com um aumento das

doses os comportamentos de fuga e saltos também são observados (KINCHESKI, 2011).

Uma tendência natural de roedores é de procurar um ambiente escondido quando se deparam com situações de perigo, desta forma, o tempo escondido aumenta e o tempo de aproximação consequentemente, reduz (DIELENBERG e MCGREGOR, 2001). Assim, durante a avaliação da eficiência do condicionamento, na caixa de odor, a dose de 100 pmol de NMDA na MCPdl foi capaz de aumentar significativamente o tempo escondido e reduzir o tempo de aproximação da fonte de odor. Por haver respostas defensivas frente ao odor condicionado, nas sessões EC1 e EC2 os resultados sugerem que a microinjeção deste agonista glutamatérgico funciona como EI que induz aprendizado (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012).

O protocolo utilizado no presente estudo excluiu a sessão de familiarização para permitir a obtenção de informações da estratégia comportamental durante a exposição ao EC e ao contexto (EC1 e EC2, respectivamente). Desta forma, esta modificação do protocolo exigiu uma padronização inicial, realizada a partir da infusão de NMDA na MCPd. Os dados comportamentais obtidos neste experimento foram analisados e mostraram o perfil de estratégia defensiva, definida pelo rato, tanto durante a aquisição do condicionamento quanto durante os testes EC1 e EC2. Foi considerado como estratégia defensiva para a sessão de condicionamento, o aumento dos comportamentos de fuga, saltos e congelamento e uma redução de comportamentos exploratórios de levantar e explorar. Para as sessões EC1 e EC2 o aumento do tempo no compartimento escondido foi considerado como estratégia defensiva, uma redução do tempo de aproximação à fonte de odor e para este protocolo uma diminuição do *head out*.

Com relação à uma análise da estratégia comportamental dos animais tratados com NMDA na caixa de odor, não há expressão de comportamentos defensivos no início da sessão EC1 (três primeiros minutos). Com o decorrer da sessão EC1, a tomada de decisão é definida, precisamente após o terceiro minuto no qual o animal passa a demonstrar os comportamentos defensivos de: aumento de tempo no compartimento escondido e redução no tempo de aproximação à fonte de odor. Os primeiros três minutos, desta forma, podem ser considerados o momento no qual o animal interpreta os estímulos ambientais e, ao explorar a caixa, define o compartimento que parece ser o mais seguro, permanecendo um tempo maior neste espaço. Esta

mesma estratégia se mostra definida na sessão EC2, não sendo mais alterada significativamente ao comparar-se com os dois últimos minutos da sessão EC1.

Comparando resultados obtidos com trabalhos recentes do laboratório com o presente estudo, evidenciou-se que os valores basais obtidos para o tempo no compartimento escondido, o tempo de aproximação e de *head out* foram alterados. No protocolo padronizado por Kinckeski (2011) mais de uma dose de NMDA foi injetada na MCPdl. O grupo que recebeu 50 pmol de NMDA mostrou valores de tempo escondido de 50% na sessão EC1 e EC2. Um tempo de aproximação à fonte de odor de 25% e 28%, EC1 e EC2, respectivamente, e o tempo de *head out* de 10% e 8% na sessão EC1 e EC2, respectivamente. Entretanto, os animais que receberam 50 pmol de NMDA, no presente protocolo, escondem-se 50% do tempo na sessão EC1 e 70% na sessão EC2. O tempo de aproximação foi de 28% e 12% EC1 e EC2, respectivamente. E o tempo de *head out* foi de 7% nas duas sessões. Os valores obtidos com a dose de 50 pmol, no presente trabalho, nos permite sugerir que esta dose foi capaz de promover aprendizagem revelada pela resposta defensiva frente ao EC. Com base nessa comparação, pode-se assumir que o fato do animal não possuir uma experiência prévia na caixa de odor (familiarização) permitiu que sua estratégia comportamental fosse analisada, revelando que esta estratégia foi diferente ao longo do tempo na sessão EC1. Ao excluir a sessão de familiarização, o grupo NMDA apresentou menos tempo de *head out* do que o grupo PBS. Sendo o tempo de *head out* interpretado como um comportamento de avaliação de risco, o fato dos animais tratados com NMDA expressarem menos este comportamento sugere que a estratégia comportamental já foi definida, ou seja, os animais não necessitam reavaliar a situação e permaneceram no ambiente escondido.

Vale lembrar que, ao analisar comportamentos, não se pode descartar a possibilidade de ocorrer o efeito denominado transição, no qual repetidas exposições a um aparato experimental podem mudar a linha de base dos resultados obtidos na sessão de teste, pois se assume que cada experiência leva a um processo mnemônico que pode mudar a qualidade da resposta emocional nos ensaios subsequentes (BERTOGLIO e CAROBREZ, 2000; HOLMES e RODGERS, 1998). Uma análise detalhada das sessões de familiarização, EC1 e EC2 foi realizada por Sobota (2013). Nesta análise, a autora sugere que o animal desenvolve uma estratégia de enfrentamento frente ao ambiente assim que entra em contato com a caixa de odor, sugerindo também que

qualquer experiência prévia pode alterar o comportamento expresso pelos animais.

Efeito da bicuculina

Os dados obtidos com a administração de bicuculina sobre a aquisição do condicionamento olfatório aversivo mostrou diferenças nas respostas defensivas dos animais tratados com bicuculina 40 pmol, com relação ao grupo PBS. Houve redução significativa dos comportamentos exploratórios nos animais tratados com bicuculina 20 pmol e 40 pmol, quando comparado com o grupo PBS. No presente estudo, a microinjeção de bicuculina na MCP desencadeou comportamentos de fuga e salto, intercalados por curtos períodos de congelamento, como já descrito em trabalhos anteriores com estimulação elétrica (BORELLI, FERREIRA-NETTO, *et al.*, 2005; GRAEFF, BRANDÃO, *et al.*, 1986). Porém, essa estimulação foi incapaz de promover aprendizagem, apesar da bicuculina desencadear respostas de defesa mais intensas do que o NMDA. No dia do condicionamento existem diferenças entre os comportamentos exibidos pelos animais tratados com bicuculina e PBS. Apesar de não existir um padrão comportamental pré-definido, ou seja, não é possível saber qual a sequência de comportamentos exibida pelos animais ao longo do tempo, foi possível detectar uma prevalência de comportamentos exploratórios ou defensivos ao longo do tempo. De uma forma geral, o início da sessão de condicionamento, para os animais tratados com bicuculina é marcada por comportamentos defensivos, expressos em intensidades diferentes e o final da sessão é marcado por comportamentos exploratórios.

Comparado com a administração de NMDA 50 pmol, que provoca pouca fuga no primeiro minuto da sessão de condicionamento e, posteriormente o comportamento passa a ser o de congelamento, a administração de bicuculina provoca fuga mais intensa e mais duradoura. A fuga provocada pela bicuculina é intercalada com saltos e congelamento no início da sessão. Com o passar do tempo, o congelamento fica evidente e não ocorrem mais nem fuga nem saltos. Ao sair da postura de congelamento, o que ocorre geralmente no final da sessão de condicionamento, o *crouch sniffing* e os comportamentos de levantar e explorar, bem como auto-limpeza ficam evidentes. Os animais do grupo controle apresentam um nível basal de congelamento, o qual é justificado pelo fato de não conhecerem a caixa de

condicionamento e terem uma estimulação mecânica da MCPd com a microinjeção de PBS. Contudo, o padrão comportamental observado para o grupo controle inclui exploração, auto-limpeza e levantamentos já no início da sessão de condicionamento. O comportamento de *crouch sniffing* é observado quando o animal inicia a busca de pistas ambientais, na postura agachado, mas executando movimentos da cabeça (BLANCHARD, NIKULINA, *et al.*, 1998). Contudo, no presente estudo, o comportamento de *crouch sniffing* não diferiu entre os grupos PBS e bicuculina 20 ou 40 pmol. O comportamento de auto-limpeza, tem como função o “cuidado da superfície corporal” (SPRUIJT, VAN HOOFF e GISPEN, 1992). Um animal naïve pode executar este comportamento quando exposto a um novo contexto (JOLLES, ROMPA-BARENDREGT e GISPEN, 1979). Vale ressaltar que este comportamento pode reduzir quando o animal entra em contato com algum agente estressor (SPRUIJT, VAN HOOFF e GISPEN, 1992). Porém, com relação ao comportamento de auto-limpeza não houve diferenças relevantes entre os grupos bicuculina 20 pmol, bicuculina 40 pmol e PBS.

Tem sido sugerido que existem diferentes tipos de congelamento. Incluindo um congelamento ativo no qual o animal é capaz de perceber alterações no contexto e ter um aprendizado, mas também existe um congelamento no qual o sistema sensorial ficaria temporariamente impossibilitado de processar informações exteriores, em um congelamento defensivo, desta forma impossibilitando um condicionamento quer seja a uma pista ou a um contexto. Em um contexto clínico estes diferentes tipos de padrões defensivos vem sendo associados com diferentes tipos específicos de ansiedade (para revisão ver VIANNA e BRANDÃO, 2003; BRANDÃO, ZANOVELI, *et al.*, 2008; VIANNA, LANDEIRA-FERNANDEZ e BRANDÃO, 2001).

A análise da estratégia comportamental dos animais tratados com bicuculina 20 pmol e 40 pmol mostraram comportamentos distintos daqueles observados no grupo NMDA. Nos animais tratados com NMDA, a estratégia de defesa frente ao odor condicionado foi definida após os 3 primeiros minutos da sessão de EC1. Entretanto, os animais tratados com bicuculina não desenvolveram uma estratégia defensiva frente ao odor. Na sessão de EC1, o tempo escondido é igual nos grupos PBS, bicuculina 20 e 40 pmol, sendo que os comportamentos mantêm-se constantes ao longo do tempo. O tempo de aproximação não foi alterado ao longo do tempo e se manteve significativamente igual nesses grupos. Com relação ao de tempo de *head out*, nas sessões EC1 e EC2

estes também foram iguais. Estes resultados mostram que as estratégias comportamentais não representam comportamentos de defesa. Desta forma, sugere-se que não houve aprendizado frente ao odor condicionado quando os animais são tratados com bicuculina, ressaltando que o tempo na sessão de condicionamento não foi capaz de modificar estas estratégias nas sessões EC1 e EC2.

Não foram encontrados na literatura trabalhos que utilizem bicuculina para bloquear a transmissão GABAérgica da MCP com o objetivo de avaliar o aprendizado. Contudo, alguns trabalhos discutem os efeitos da manipulação GABAérgica na ativação de respostas defensivas durante a estimulação por meio de microinjeções de inibidores da enzima glutamato descarboxilase (GAD) como a semicarbazida ou L-alilglicina (que resultam em menor síntese de GABA), ou de antagonistas GABAérgicos, tais como bicuculina, dentro da MCP que são manipulações semelhantes à estimulação elétrica da MCP (BRANDÃO, DE AGUIAR e GRAEFF, 1982). A L-alilglicina na dose de 5µg na MCPd induz congelamento e saltos, sugerindo o envolvimento de mecanismos GABAérgicos no controle da expressão de respostas defensivas (CUNHA, ZANOVELI, *et al.*, 2010). Di Scala e Sandner (1989) demonstraram que a infusão de semicarbazida na MCP, promoveu o condicionamento aversivo de lugar de uma forma dependente da dose. Das três doses testadas no trabalho (3µg, 6µg e 9µg), os autores constataram que apenas a dose de 6µg foi eficaz em gerar aprendizado. A dose de 9µg, apesar de conseguir efeitos mais evidentes de resposta defensiva, não levou ao aprendizado. Os autores discutem que doses mais altas precisam de um tempo maior de contato com o estímulo neutro para que este adquira uma valência aversiva, pois o estado emocional aversivo evocado pela MCP capaz de gerar aprendizado ocorre após as alterações motoras (fuga e imobilidade) (DI SCALA e SANDNER, 1989). Em concordância, resultados recentes de nosso laboratório demonstraram que o tempo da sessão de condicionamento é um fator determinante para promover a associação do estímulo neutro com a valência aversiva da estimulação química da MCP (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012). No presente trabalho, o tempo da sessão de condicionamento foi aumentado, permitindo que o animal permanecesse mais tempo em contato com o odor. Porém, esta intervenção não foi suficiente para produzir aprendizagem. Neste contexto, é relevante ressaltar que inibidores da GAD, como a semicarbazida, promovem uma redução gradual dos

níveis de GABA na fenda sináptica, gerando preferencialmente uma resposta comportamental de congelamento, diferente do que ocorre com a administração de antagonistas GABAérgicos, como a bicuculina, capaz de desencadear uma redução abrupta da transmissão GABAérgica, gerando preferencialmente resposta de fuga (CUNHA, ZANOVELI e LEDVINKA-FILHO, 2010; BRANDÃO, BORELLI, *et al.*, 2005).

Trabalhos demonstram que o bloqueio GABAérgico com semicarbazida na MCPdl ativa a expressão da proteína *fos* em neurônios do núcleo laterodorsal do tálamo, do núcleo basolateral da amígdala e da MCP dorsomedial (ZANOVELI, FERREIRA-NETTO e BRANDÃO, 2007), bem como da MCPvl (BORELLI, FERREIRA-NETTO, *et al.*, 2005), estruturas envolvidas no processamento sensorial e aquisição de memórias aversivas. Por outro lado, a microinjeção de bicuculina ativa expressão de *fos* nas colunas da MCP, nos núcleos hipotalâmicos, no núcleo central da amígdala, no núcleo cuneiforme e no *locus coeruleus*, estruturas de processamento sensorial e de saída motora (BORELLI, FERREIRA-NETTO, *et al.*, 2005). Essas diferenças no padrão de regiões ativadas podem explicar por que a estimulação da MCPdl com bicuculina não levou a um aprendizado.

Com relação ao sistema GABAérgico, na MCP ele é constituído principalmente de interneurônios. É assumido que pela característica de inibir uma célula neuronal este neurotransmissor exerça um controle inibitório sobre a MCP, devido ao mecanismo de diminuir a despolarização de neurônios que contenham aminoácidos excitatórios como, por exemplo, o glutamato (DEPAULIS e BANDLER, 1991). O uso de antagonistas GABAérgicos impede o controle inibitório do GABA e promove a liberação de aminoácidos excitatórios entre eles, o glutamato (para revisão ver BRANDÃO, CARDOSO, *et al.*, 1994). Este neurotransmissor excitatório tem a capacidade de ativar, dentre outros receptores, os de NMDA (para revisão ver CAROBREZ, TEIXEIRA e GRAEFF, 2001). No protocolo de condicionamento olfatório já foi demonstrado que quando este receptor é estimulado pelo agonista exógeno (NMDA) existe a formação de uma memória olfatória aversiva (KINCHESKI, MOTA-ORTIZ, *et al.*, 2012). A nossa hipótese baseou-se nestes dados da literatura, os quais sugerem que bloqueio GABAérgico ativaria a MCP por liberar aminoácidos excitatórios. Juntamente com isso, o fato do nosso laboratório já ter demonstrado que a ativação dos receptores NMDA gerou aprendizado, foi delineado um estudo para verificar se o sistema GABAérgico poderia ser um EI

eficaz. Porém, com base nos resultados aqui obtidos, não foi observado aprendizado. Desta forma, abrindo possibilidades para investigações futuras, sugerimos uma possível participação de outros sistemas neurotransmissores que possam controlar o aprendizado. O sistema opióide seria uma possibilidade, pois os neurônios GABAérgicos estão sob controle inibitório deste sistema (para revisão ver BRANDÃO, CARDOSO *et al.*, 1994; JACQUET e SQUIRES, 1988; JACQUET e LAJTHA, 1974). O sistema serotoninérgico, que apresenta uma função chave no que diz respeito a efeitos anti-aversivos na MCP (GRAEFF, BRANDÃO *et al.*, 1986) e também sistemas moduladores de neuropeptídeos como, por exemplo, a substância P (AGUIAR e BRANDÃO, 1996). Como mencionado anteriormente, trabalhos anteriores demonstraram que a redução da transmissão GABAérgica na MCP é capaz de promover condicionamento contextual (DI SCALA e SANDNER, 1989). Entretanto, existem diferenças metodológicas importantes entre o presente estudo e os trabalhos acima citados (paradigmas comportamentais, tempos de condicionamento, manipulação farmacológica), que poderiam explicar os resultados divergentes.

Quando apenas se observa a resposta defensiva na etapa de aquisição, tanto a infusão de NMDA quanto de bicuculina desencadeiam efeitos finais comuns, sugerindo capacidades iguais de desencadear aprendizagem. Porém, apesar de aparentemente predizerem consequências semelhantes agindo como EIs eficazes, as duas drogas aqui estudadas exercem seus efeitos, provavelmente por vias de sinalização distintas ou, até mesmo, por resultarem em informações ascendentes para estruturas cognitivas diferentes. Desta forma, em que pese seu efeito fenotipicamente semelhante, o NMDA foi capaz de promover aprendizado e a bicuculina não.

Concluindo, o presente estudo caracterizou dois momentos no condicionamento olfatório aversivo, a aquisição de uma memória aversiva e a expressão de respostas de defesa ao EC e ao contexto. A análise da sessão de aquisição nos permitiu avaliar respostas defensivas e exploratórias frente à estimulação da MCPd e a análise da sessão de EC1 e EC2 nos permitiu avaliar respostas defensivas aprendidas frente ao EC e ao contexto, bem como a estratégia comportamental adotada frente ao EC. Com base nos resultados obtidos, a resposta defensiva na sessão de aquisição foi segregada da estratégia defensiva da sessão de EC1 e EC2. Desta forma, comportamentos de defesa na sessão de

condicionamento não são capazes de predizer se haverá aprendizagem a uma pista olfatória. Por outro lado, a exclusão da sessão de familiarização permitiu a análise do momento de desenvolvimento de uma estratégia defensiva durante a sessão de exposição ao EC. Esta alteração no protocolo agregou informações para o entendimento da estratégia de enfrentamento dos animais frente ao EC. A estratégia de enfrentamento frente a alterações do ambiente e ao EC foram analisadas minuciosamente após a administração de NMDA, inclusive com uma dose mais baixa comparada com doses testadas em estudos anteriores (KINCHESKI, 2011) e após a administração de bicuculina. A mesma estratégia defensiva emitida pelo grupo NMDA não correspondeu à estratégia defensiva nos animais tratados com bicuculina sugerindo que o antagonismo dos receptores GABA_A não constituiu em EI eficaz em dar suporte para o condicionamento olfatório aversivo.

6. Sumário e Conclusão

Em resumo, os resultados do presente trabalho mostraram que:

- 1) A ausência da sessão de familiarização permitiu a análise do desenvolvimento de uma estratégia defensiva durante a sessão de exposição ao EC e ao contexto nos animais tratados com NMDA 50 pmol. Esta alteração no protocolo agregou informações para o entendimento da estratégia de enfrentamento dos animais condicionados frente ao EC.
- 2) A estratégia de comportamentos defensivos e exploratórios durante a ativação da MCP com NMDA no processo de aquisição do condicionamento e durante a exposição ao EC, confirma que o NMDA é um EI eficaz em promover o condicionamento olfatório aversivo.
- 3) Os efeitos da administração de bicuculina desencadearam um aumento de comportamentos defensivos e redução de comportamentos exploratórios durante a sessão de condicionamento. Entretanto, este padrão de ativação não resultou em um EI eficaz para promover aprendizagem nos parâmetros avaliados no presente estudo.

Com base nos dados obtidos verificou-se que a capacidade de induzir comportamentos defensivos durante a sessão de condicionamento não permite “*per se*” prever a formação de uma memória aversiva no protocolo de condicionamento olfatório aversivo. Desta forma, a hipótese do presente trabalho sugerindo que a estimulação da MCPd por meio do bloqueio dos receptores GABA_A, seria um EI eficaz em promover aprendizagem não foi comprovada. Contudo, os resultados do presente estudo nos levam a sugerir a existência de uma dissociação farmacológica na MCPd com relação ao processo de aprendizagem. Neste sentido, futuras investigações poderão ser feitas para desvendar de que forma a MCP influencia o processo de aquisição de uma memória olfatória aversiva.

Referências

- AGUIAR, M.; BRANDÃO, M. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray of rats submitted to the plus maze test. **Physiology Behavior**, v. 60, p. 1183-1186, 1996.
- BANDLER, R.; SHIPLEY, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? **Trend Neuroscience**, v. 17, 1994.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências Desvendando o Sistema Nervoso**. 3º. ed. [S.l.]: Artmed, 2008.
- BEHBEHANI, M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. **Progress in Neurobiology**, v. 46, p. 575-605, 1995.
- BERTOGLIO, L.; CAROBREZ, A. Previous maze experience required to increase open arms avoidance in rats submitted to the elevated plus-maze model of anxiety. **Behavioral and Brain Research**, v. 108, p. 197-203, 2000.
- BITTENCOURT, A. *et al.* Organization of single components of defensive behaviors within distinct columns of periaqueductal gray matter of the rat: role of N-Methyl-D-Aspartic acid glutamate receptors. **Neuroscience**, v. 125, p. 71-89, 2004.
- BLANCHARD, D.; BLANCHARD, R. Ethnoexperimental approaches to the biology of emotion. **Annual Review Psychology**, v. 39, p. 43-68, 1988.
- BLANCHARD, R. *et al.* Behavioral and endocrine change following chronic predatory stress. **Physiology and Behavior**, v. 63, p. 561-569, 1998.
- BLANCHARD, R.; BLANCHARD, D. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. **Journal of Comparative Psychology**, v. 103, p. 70-82, 1989.
- BORELLI, K. *et al.* Fos-like immunoreactivity in the brain associated with freezing or escape induced by inhibition of either glutamic acid decarboxylase or GABAA receptors in the dorsal periaqueductal gray. **Brain Research**, v. 1051, p. 100-111, 2005.
- BORELLI, K. G.; FERREIRA-NETTO, C.; BRANDÃO, M. L. Distribution of Fos immunoreactivity in the rat brain after freezing or escape elicited by inhibition of glutamic acid decarboxylase or antagonism of GABA-A receptors in the inferior colliculus. **Behavioural Brain Research**, v. 170, p. 84-93, 2006.

BOWERY, N. *et al.* Mammalian γ -aminobutyric acid B receptors: Structure and function. **International Union Pharmacological XXXIII Pharmacological Reviews**, p. 247-264, 2002.

BRANDÃO, M. L. *et al.* The neural substrate of defensive behavior in the midbrain tectum. **Neuroscience Biobehavioral Reviews**, v. 18, p. 339-346, 1994.

BRANDÃO, M. L. *et al.* Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. **Behavioural Brain Research**, v.188, p. 1-13, 2008.

BRANDÃO, M. L. *et al.* Neurochemical mechanisms of the defensive behavior in the dorsal midbrain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 23, p. 863-875, 1999.

BRANDÃO, M. L. *et al.* Gabaergic regulation of the neural organization of fear in the midbrain tectum. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 1299-1311, 2005.

BRANDÃO, M.; DE AGUIAR, J.; GRAEFF, F. GABA mediation of anti-aversive action of minor tranquilizers. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 16, p. 397-402, 1982.

BUCK, L. B. Unraveling the sense of smell (Nobel Lecture). **Harvey Lecture**, v. 44, p. 6128-6140, 2005.

CAMERON, A. *et al.* The efferent projections of the periaqueductal gray in the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study. I. Ascending projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 351, p. 568-584, 1995.

CANTERAS, N. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 71, p. 481-491, 2002.

CANTERAS, N.; GOTO, M. Fos-like immunoreactivity in the periaqueductal gray of rats exposed to a natural predator. **Neuroreport**, v. 10, p. 413-418, 1999.

CAROBREZ, A. P.; TEIXEIRA, K. V.; GRAEFF, F. G. Modulation of defensive behavior by periaqueductal gray NMDA/glycine-B receptor. **Neuroscience and biobehavioral review**, v. 25, p. 697-709, 2001.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L.; CAROBREZ, A. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, p. 512-518, 2009.

- CHEN, N.; REITH, M. E. A.; QUICK, M. Synaptic uptake and beyond: the sodium and chloride dependent neurotransmitter transporter family SLC6. **European Journal of Physiology**, v. 447, p. 519-531, 2004.
- COMOLI, E.; RIBEIRO-BARBOSA, E.; CANTERAS, N. Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG. **Behavioural Brain Research**, v. 138, p. 17-28, 2003.
- CUNHA, J. M.; ZANOVELI, J. M.; LEDVINKA-FILHO, E. BRANDÃO, M. L. L-Allylglycine dissociates the neural substrates of fear in the periaqueductal gray of rats. **Brain Research Bulletin**, v. 81, p. 416-423, 2010.
- DE ARAÚJO, J.; BRANDÃO, M.; HUSTON, J. Aversive effects of the C-fragment of substance P in the dorsal periaqueductal gray matter. **Experimental Brain Research**, v. 123, p. 84-89, 1998.
- DEPAULIS, A.; BANDLER, R. **The Midbrain Periaqueductal Gray Matter Functional, Anatomical, and Neurochemical Organization**. New York: Plenus Press, v. 213, 1991.
- DI SCALA, G.; SANDNER, G. Conditioned place aversion produced by microinjections of semicarbazide into the periaqueductal gray of the rat. **Brain Research**, p. 91-97, 1989.
- DIELENBERG, R. A.; MCGREGOR, I. S. Defensive behavior in rats towards predatory odors: a review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 2001. 597-609.
- GELLER, I.; KULAK, J. T.; SEIFTER, J. The effects of chlordiazepoxide and chlorpromazine on a punishment discrimination. **Psychopharmacology**, v. 3, p. 374-385, 1962.
- GEWIRTZ, J.; DAVIS, M. Using pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learning and memory**, v. 7, p. 257-266, 2000.
- GOMES, J.; AMARAL, V.; NUNES-DE-SOUZA, R. Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 219, p. 248-253, 2011.
- GOMITA, Y. *et al.* Effects of anxiolytic drugs on escape behavior induced by dorsal central gray stimulation in rats. **Physiology Behavior**, v. 49, p. 125-129, 1991.
- GRAEFF, F. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, v. 27, p. 811-829, 1994.

GRAEFF, F. *et al.* Modulation of the brain aversive system by GABAergic and serotonergic mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 21, p. 65-72, 1986.

GRAEFF, F. G. *et al.* Role of GABA in the anti-aversive action of anxiolytics. **Biochemistry Psychopharmacology**, v. 42, p. 79-86, 1986.

GROSS, C. T.; CANTERAS, N. S. The many paths to fear. **Nature reviews Neuroscience**, v. 13, p. 651-658, 2012.

HERRY, C.; JOHANSEN, J. P. Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. **Nature Neuroscience**, p. 1644-1654, 2014.

HOLMES, A.; RODGERS, R. Responses of Swiss-Webster mice to repeated plus-maze experience: further evidence for a qualitative shift in emotional state? **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 60, p. 473-488, 1998.

HOMBERG, J. R. Measuring behaviour in rodents: Towards translational neuropsychiatric research. **Behavioural and brain research**, v. 236, p. 295-306, 2013.

JACQUET, Y. F.; SQUIRES, R. Excitatory amino acids role in morphine excitation in rat periaqueductal gray. **Behavioural Brain Research**, v. 31, p. 85-88, 1988.

JACQUET, Y.; LAJTHA, A. Paradoxical effects after microinjection of morphine in the periaqueductal gray matter in the rat. **Science**, v. 185, p. 1055-1057, 1974.

JOHNSTON, G. GABA_A receptor pharmacology. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 69, p. 173-198, 1996.

JOLLES, J.; ROMPA-BARENDREGT, J.; GISPEN, W. Novelty and grooming behavior in the rat. **Behavioral Neural Biology**, v. 25, p. 563-572, 1979.

KEELER, J.; ROBINS, T. Translating cognition from animals to humans. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 1356-1366, 2011.

KIM, J.; MCNALLY, G.; RICHARDSON, R. Recovery of fear memories in rats: role of GABA in infantile amnesia, v. 120, p. 40-48, 2006.

KINCHESKI, G. C. **Condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaqueductal dorsolateral de ratos.** (Tese de doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

- KINCHESKI, G. C. *et al.* The dorsolateral Periaqueductal gray and its role in mediating fear learning to life threatening events. **Plos one**, v. 7, p. 1-14, 2012.
- KROON, J. A.; CAROBREZ, A. P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: Effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 32-40, 2009.
- JACOB, T.C., MOSS, S.J., JURD, R. GABA_A receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews* v.9, p.331-343, 2008.
- LAL, H.; EMMETT-OGLESBY, M. Behavioral analogues of anxiety. Animal models. **Neuropharmacology**, v. 22, p. 1423- 1441, 1983.
- LEDOUX, J. Emotion circuits in the brain. **Annual Review Neuroscience**, p. 155-184, 2000.
- LEDOUX, J. The emotional brain, fear and the amygdala. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 23, p. 727-738, 2003.
- MACDONALD, R.; OLSEN, R. GABA_A receptor channels. **Annual Review of Neuroscience**, v. 17, p. 569-602, 1994.
- MADSEN, K. *et al.* Synaptic and extrasynaptic GABA transporters as targets for anti-epileptic drugs. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, p. 139-144, 2009.
- MAKKAR, S. R.; ZHANG, S. Q.; CRANNEY, J. Behavioral and Neural Analysis of GABA in the Acquisition, Consolidation, Reconsolidation, and Extinction of Fear Memory. **Neuropsychopharmacology**, p. 1625-1652, 2010.
- MARTIN, D.; OLSEN, R. GABA in the nervous system: The view at 50 years.. **Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins**, 2000.
- MARTINS, M. A.; CAROBREZ, A. P.; TONUSSI, C. Activation of dorsal periaqueductal gray by glycine produces long lasting hyponociception in rats without overt defensive behaviors. **Life Sciences**, v. 83, p. 118-121, 2008.
- MEHTA, A.; TICKU, M. An update on GABA_A receptors.. **Brain Research Review**, p. 196-217, 1999.
- MOCHNY, C. *et al.* Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 237, p. 76-81, 2013.
- MOTTA, V.; BRANDÃO, M. Aversive and antiaversive effects of morphine in the periaqueductal gray of rats submitted to elevated plus-maze test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 44, p. 119-125, 1993.

MUNGER, S. D.; LEINDERS-ZUFALL, T.; ZUFALL, F. Subsystem Organization of the Mammalian Sense of Smell. **Annual Review Physiology**, v. 71, p. 115-140, 2009.

OLSEN, R.; BETZ, H. **Basic neurochemistry**. 7th. ed. Boston: Elsevier Academic Press, 2006.

OLSEN, R.; BETZ, H. **GABA and glycine**. In **G. J. Siegel, R. W. Albers, S. T. Brady**. 7th. ed. [S.l.]: Elsevier Academic Press, 2006.

PAVESI, E.; CANTERAS, N. S.; CAROBREZ, A. P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using b-adrenoceptor activation of the dorsal preammylary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology** , v. 36, p. 926-939, 2011.

PAVLOV, I. P. Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex. **Oxford University Press**, 1927.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. **Academic Press**, 1982.

PINARD, A.; SEDDIK, R.; BETTLER, B. GABAB receptors: Physiological functions and mechanisms of diversity. **Advances in Pharmacology** , v. 58, p. 231-255, 2010.

PIRKER, S. et al. GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult brain. **Neuroscience** , v. 101, p. 815–850, 2000.

REICHLING, D. B.; BASBAUM, A. I. Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: I. GABA-immunoreactive projection neurons in the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 302, p. 370-377, 1990.

RESTREPO, D. et al. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. **Hormones Behavior**, v. 46, p. 247-256, 2004.

RIZVI, T. et al. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. **Journal of Comparative Neurology**, v. 303, p. 121-131, 1991.

SCHENBERG, L.; GRAEFF, F. Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 9, p. 287-295, 1978.

- SKULTETY, F. Stimulation of periaqueductal gray and hypothalamus. **Archives of Neurology and Psychiatry**, v. 8, p. 608-620, 1963.
- SOBOTA, K. N. **Análise da estratégia de enfrentamento comportamental (coping style) durante o condicionamento olfatório aversivo.**(Dissertação de mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. The ethology and neurobiology of grooming behaviour. **Physiological Reviews**, p. 825-852, 1992.
- VIANNA, D. M. L.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J.; BRANDÃO, M. L. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear. **Neuroscience and Behavioral Review**, v. 25, p. 711-719, 2001.
- VIANNA, D.; BRANDÃO, M. Anatomical connections of the periaqueductal gray: specific neural substrates for different kinds of fear. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 557-566, 2003.
- WILLIAMS, F. G.; BEITZ, A. J. Ultrastructural morphometric analysis of enkephalin-immunoreactive terminals in the ventrocaudal periaqueductal gray: Analysis of their relationship to periaqueductal gray-raphe magnus projection neurons. **Neuroscience**, v. 38, p. 381-394, 1990.
- WINGSTROM, H.; GUSTAFSSON, B. Large long-lasting potentiation in the dentate gyrus in vitro during blockade of inhibition. **Brain Research**, v. 275, p. 153-158, 1983.
- ZANOVELI, J. M.; FERREIRA-NETTO, C.; BRANDÃO, M. L. Conditioned place aversion organized in the dorsal periaqueductal gray recruits the laterodorsal nucleus of the thalamus and the basolateral amygdala. **Experimental Neurology**, v. 208, p. 127-136, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 - Preparação e coloração das lâminas histológicas com Giemsa

As lâminas passaram por um processo de gelatinização, no qual 250 ml de água destilada foi aquecida à 60/70 °C, sob agitação e foi acrescentado 0,125g de cromo alúmem. Após, as lâminas foram mergulhadas nesta solução.

Para hidratação, as lâminas foram lavadas duas vezes em uma cuba contendo água destilada, durante 2 min. Após, foram passadas nos álcoois 70%, 90% 100%, 100%, depois 2 min em Citrisolv duas vezes.

Para a coloração, as lâminas foram imersas em corante Giemsa por 6 min e lavadas com água destilada. Posteriormente as lâminas foram passadas nos álcoois 70%, 90% 100%, 100% 2 min em cada e fixadas em Citrosolv, duas vezes 5 min cada.

As lâminas ficaram por um período mínimo de 48h antes de colar a lâminula, procedimento este que foi feito com DPX (resina sintética).

ANEXO 2 - Comportamentos analisados na sessão de condicionamento nos animais microinjetados com NMDA

O grupo PBS não apresentou fuga durante a sessão de condicionamento. O comportamento de recuo defensivo não foi observado nos animais que receberam PBS ou NMDA. O comportamento de fuga foi observado em 4 dos 10 animais pertencentes ao grupo NMDA 50 pmol, e foi observado apenas no 1º minuto da sessão (Tabela 1).

Tabela 1. Comportamento de fuga observado durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min %)	Parte II (6-10 min %)
Controle (PBS)	0	0
NMDA (50 pmol)	0,11±0,05%	0

Durante a sessão de condicionamento, também foram avaliados os comportamentos de auto-limpeza (Tabela 2) e o comportamento de *crouch-sniffing* (Tabela 3) que não foram enquadrados nas categorias defensivos ou exploratórios. A ANOVA não detectou diferenças significativas entre os tratamentos no comportamento de auto-limpeza [$F(1, 29)=0,14511$, $p=0,70603$] nem para o comportamento de *crouch sniffing* [$F(1, 20)=3,1766$, $p=0,08989$].

Tabela 2. Comportamento de auto-limpeza observado durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min %)	Parte II (6-10 min %)
Controle (PBS)	7,32 ± 1,14	9,68 ± 0,89
NMDA (50 pmol)	4,23 ± 1,99	6,82 ± 2,57

Tabela 3. Comportamento de *crouch sniffing* observado durante a sessão de condicionamento.

Tratamento	Parte I (0-5 min %)	Parte II (6-10 min %)
Controle (PBS)	9,75 ± 1,52	9,67 ± 2,13
NMDA (50 pmol)	5,87 ± 1,98	6,32 ± 1,39

ANEXO 3- Comportamentos analisados na sessão de condicionamento nos animais com microinjeções de bicuculina 40 pmol no colículo

Animais injetados com bicuculina 40 pmol, na estrutura colículo (superior e inferior) nos tempo de 10 e 20 min. Durante a sessão de condicionamento, os animais tratados com bicuculina 40 pmol no colículo exibiram $33,21 \pm 8,83$ % de comportamentos defensivos e $57,45 \pm 10,72$ % de comportamentos exploratórios. A figura 1 mostra os comportamentos defensivos e exploratórios minuto-a-minuto.

As sessões de EC1 e EC2, com o tempo escondido, tempo de aproximação e o tempo de *head out* são mostrados na tabela 1 para o condicionamento de 10 min e na tabela 2 para o condicionamento de 20 min.

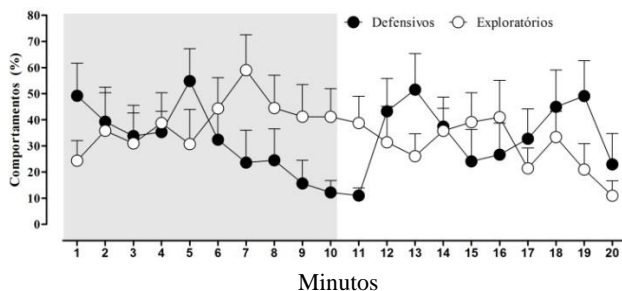


Figura 1. Comportamentos defensivos e exploratórios durante 20 min, avaliação minuto-a-minuto. Os pontos mostram média \pm e.p.m. bicuculina 40 pmol (n=8).

Tabela 1. Comportamentos analisados na sessão de condicionamento.

	Parte I (0-5 min %)	Parte II (6-10 min %)	Parte III (11-20 min %)
Fuga	11,30 \pm 6,32	6,89 \pm 5,22	0,1 \pm 0,09
Auto-limpeza	1,72 \pm 1,11	10,20 \pm 4,29	18,53 \pm 3,7
Crouch-snifing	15,67 \pm 3,83	15,69 \pm 3,94	11,80 \pm 1,70

Tabela 2. Estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2 animais injetados com bicuculina 40 pmol no colículo. Sessão de Condicionamento de 10 min. Dados são mostrados em porcentagem da média \pm e.p.m.

	EC1 (1-2-3 min)	EC1 (4-5 min)	EC1 (1-5 min)	EC2 (1-5 min)
Tempo escondido	37,04 \pm 4,73	30,57 \pm 3,04	34,45 \pm 3,62	49,83 \pm 4,49
Tempo de aproximação	31,56 \pm 3,27	33,85 \pm 4,18	32,47 \pm 3,02	20,97 \pm 1,66
Head out	2,91 \pm 0,53	3,02 \pm 0,51	8,42 \pm 1,11	12,13 \pm 1,27

Tabela 3. Estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2 animais injetados com bicuculina 40 pmol no colículo. Sessão de condicionamento de 20 min. Dados são mostrados em porcentagem da média \pm e.p.m.

	EC1 (1-2-3min)	EC1 (4-5 min)	EC1 (1-5 min)	EC2 (1-5 min)
Tempo escondido	50,69 \pm 9,17	42,50 \pm 6,77	47,41 \pm 7,86	60,75 \pm 8,52
Tempo de aproximação	21,80 \pm 5,35	35,00 \pm 5,42	27,08 \pm 4,84	20,62 \pm 5,08
Head out	5,27 \pm 1,08	5,20 \pm 1,69	10,59 \pm 1,65	8,13 \pm 0,99

(n=8) bicuculina 40 pmol

ANEXO 4- Comportamentos analisados na sessão de condicionamento nos animais com microinjeções de bicuculina 40 pmol e PBS, grupo *OUT*

Animais injetados com bicuculina 40 pmol ou PBS, grupo *OUT* (aqueduto cerebral) no tempo de 20 min também foram analisados para verificar as respostas comportamentais durante a sessão de condicionamento e expressão. Durante a sessão de condicionamento, os animais tratados com bicuculina 40 pmol, pertencentes ao grupo *OUT* exibiram $68,41 \pm 14,38$ % de comportamentos exploratórios e $31,15 \pm 10,84$ % de comportamentos defensivos. Os animais tratados com PBS $21,78 \pm 2,87$ % de comportamentos defensivos e $69,51 \pm 7,91$ % de comportamentos exploratórios. A figura 1 mostra os comportamentos defensivos e exploratórios minuto-a-minuto. Neste caso, a parte em cinza destacada no gráfico representa a estratégia até o 10º minuto, porém não inclui animais condicionados por 10 min.

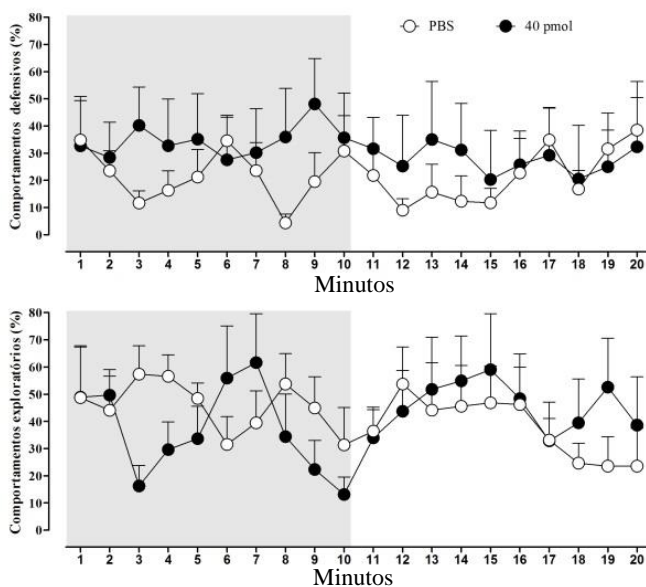


Figura 1. Comportamentos defensivos e exploratórios durante 20 min, avaliação minuto-a-minuto. Os pontos mostram média +e.p.m. bicuculina 40 pmol (n=5) PBS (n=5).

Ainda na sessão de condicionamento foram avaliados os comportamentos de fuga, auto-limpeza e *crouch sniffing*, estes são mostrados na tabela 1. As sessões de EC1 e EC2, com o tempo escondido, tempo de aproximação e *head out* são mostrados na tabela 2.

Tabela 1. Comportamentos analisados na sessão de condicionamento.

Comportamento/Tratamento	Parte I (0-5 min %)	Parte II (6-10 min %)	Parte III (11-20 min %)
Fuga/ PBS	0	0	0
Bicuculina 40pmol	0	0	0
Auto-limpeza/ PBS	5,77 ± 2,63	5,94 ± 1,65	10,73 ± 2,75
Bicuculina 40pmol	1,42 ± 0,93	4,94 ± 2,92	10,78 ± 2,92
Crouch-snifing/PBS	18,70 ± 4,41	28,68 ± 4,80	27,39 ± 3,32
Bicuculina 40pmol	26,24 ± 8,09	20,27 ± 4,67	14,01 ± 2,70

Tabela 2: Estratégia comportamental observada nas sessões de EC1 e EC2 animais injetados com bicuculina 40 pmol no grupo OUT. Sessão de condicionamento de 20 minutos. Dados são mostrados em porcentagem da média ± e.p.m.

	EC1 (PBS)	EC2 (PBS)	EC1 (40 pmol)	EC2 (40 pmol)
Tempo escondido	34,00±5,13	48,80±6,06	47,41±7,86	60,75±8,52
Tempo de aproximação	35,53±4,73	26,53±4,21	27,08 ±4,84	20,62±5,08
Head out	7,77±2,47	8,9±2,50	10,59±1,65	8,13±0,99